BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SISTEMA HIDROXIAPATITA-Ag_3PO_4

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN INGENIERÍA QUÍMICA

P R E S E N T A:

QUIM. ANA LOURDES HERNÁNDEZ DE HUERTA

ASESORES

DR. EFRAIN RUBIO ROSAS

M.C ERIC REYES CERVANTES

“Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará inteligente; y aunque sea débil se transformará en fuerte”

- **Leonardo Da Vinci.**

AGRADECIMIENTOS.

Mis más sincero agradecimiento al Dr. Efrain Rubio Rosas, asesor de mi tesis, y de igual manera a mi co-asesor el M.C Eric Reyes Cervantes, quienes sin su apoyo y guía de la presente trabajo nunca se hubiera llevado a cabo.

También deseo agradecer a la Lic. Ma. Lourdes Palma Tirado por su participación, así como a la Dra. Mariauxilio Osorio Lama, M.C Jose Genaro Carmona Gutierrez y la Dra. Mayra Ruiz Reyes por su consejo, enseñanza y apoyo durante mis estudios de posgrado. A mis padres y a mi esposo por su ayuda y comprensión.

Al Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este proyecto.

A todas las personas que contribuyeron, incluyendo a mis compañeros, amigos y profesores.

ABSTRACT.

Nanoparticles of HA-Ag_3PO_4 were prepared using precipitation method from calcium nitrate tetrahydrated ($Ca(NO_3)_2*4H_2O$), silver nitrate ($AgNO_3$) and ammonium phosphate monobasic ($NH_4\ H_2PO_2$) as precursors. The effect of the pH and the silver nitrate concentration were important factors to obtain HA-Ag_3PO_4 powder. Afterwards, the samples were characterized by XRD, SEM, EDS and TEM. Finally, antimicrobial activity was determined through the method of inhibition of development in solutions with enriched medium. The microorganisms selected were *E. colli, B. thuringiensis* and *Aspergillus niger*. The results show the presence of nanorods of hydroxyapatite and silver phosphate phases with diameters ranging between 40 to 50 nm with antimicrobial activity.

RESUMEN.

Las nanoparticulas de HA-Ag_3PO_4 que fueron preparadas utilizando el método de precipitación a partir del nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2*4H_2O$), nitrato de plata ($AgNO_3$) y fosfato de amonio monobásico ($NH_4\ H_2PO_2$) como precursores. El efecto del pH y la concentración de nitrato de plata fueron factores importantes en la obtención de los polvos de HA-Ag_3PO_4. Después, las muestras fueron caracterizadas por DRX, SEM, EDS y TEM. Finalmente, se realizó las pruebas antimicrobianas las cuales fueron determinadas a través del método de desarrollo de inhibición en disoluciones con medio enriquecido. Los microorganismos seleccionados fueron las bacterias: E. *colli y B. thuringiensi.,* En el caso del hongo fue el *Aspergillus niger*.

INDICE

INTROUCCIÓN. **3**

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES **6**

1.1 Biomateriales **6**
1.2 Hidroxiapatita **7**
1.2.1 Métodos de obtención de Hidroxiapatita **9**
- Sol-gel **10**
- Microemulsión **11**
- Hidrotérmico **12**
- Reacción en estado sólido **12**
- Spray pirolisis **13**
- Precipitación **13**

1.3 Problemática de los biomateriales con infecciones **14**
1.4 Plata **16**
1.4.1 Fosfato de plata **17**
1.5 Microorganismos **18**
1.5.1 Clasificación de microorganismos **19**
- Bacterias **19**
- Archea **20**
- Hongos **21**
- Protozoos **22**
- Algas **23**
- Virus **24**

1.6 Pruebas antimicrobianas **25**
1.6.1 Método de Kirby-Bauer **26**
1.6.2 Prueba de dilución en caldo **27**

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA **28**

2.1 Síntesis de hidroxiapatita a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio en solución acuosa **28**

2.2 Síntesis de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 a partir de nitrato de calcio, fosfato de amonio en solución acuosa y nitrato de plata **30**
2.3 Síntesis de Ag_3PO_4 a partir de nitrato de plata y fosfato de amonio en solución acuosa **32**
2.4 Técnicas de caracterización **34**
2.4.1 Microscopia electrónica de barrido **34**
2.4.2 Difracción de rayos X **36**
2.4.3 Microscopia electrónica de transmisión **37**
2.5 Estudio antimicrobiano **38**
2.5.1 Medio de cultivo Mueller Hinton **39**
2.5.2 Medio de cultivo papa dextrosa **39**
2.5.3 Estudio antimicrobiano para*: E. coli, B. thuringiensis* y *A. niger*. **40**

CAPÍTULO 3. RESULTADOS **44**

3.1 Muestras obtenidas a partir de la síntesis **44**
3.2 Caracterización por difracción de rayos x **45**
3.3 Caracterización por microscopia electrónica de barrido **47**
3.4 Caracterización por análisis químico elemental (EDS) **49**
3.5 Caracterización por microscopia electrónica de transmisión **52**
3.6 Estudio antimicrobiano del sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4 **55**
3.6.1 Bacteria *Escherichia coli* **55**
3.6.2 Bacteria *Bacillus thuringiensis* **56**
3.6.3 Hongo *Aspergillus niger* **58**

DISCUSIÓN **60**
CONCLUSIONES **62**

BIBLIOGRAFÍA **63**
ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS **68**

INTRODUCCIÓN

Más de cincuenta millones de personas en todo el mundo tienen implantado algún tipo de prótesis y es un hecho bien conocido en nuestra sociedad la utilidad y necesidad de todo tipo de implantes, siendo inusual que en nuestro entorno próximo, no conozcamos a alguien que lo necesite. En 2014, la tasa de crecimiento anual de la población de mayores de 60 años casi triplico la tasa de incremento de la población en su conjunto. En términos absolutos, el número de personas mayores de 60 años casi se ha duplicado entre 1994 y 2014, y las personas de ese grupo de edad superan ahora en número al de los menores de 5 años (Naciones Unidas, 2014).

El aumento de la longevidad tiene implicaciones individuales relacionadas con el mantener un buen nivel en la calidad de vida. Estos factores sociales han impulsado un gran avance en biomateriales, potencializando las investigaciones en el campo.

Los biomateriales están destinados a su aplicación en seres vivos y para su fabricación se requiere la coordinación de expertos de diversos campos. A su vez este campo ha experimentado un importante avance en los últimos años, siendo una motivación importante y considerable el aumento de la esperanza de vida de miles de personas en las décadas recientes. Según los reportes demográficos de las Naciones Unidas, el envejecimiento de la población, fenómeno debido al cual las personas de más edad representan una parte proporcionalmente mayor del total de la población. A escala mundial, la proporción de personas mayores (de 60 años o edad superior) aumentó del 9 % en 1994 al 12 % en 2014, y se espera que alcance el 21 % en 2050.

Los biomateriales deben cumplir una seria de condiciones como la biocompatibilidad y el garantizar una determinada vida media. A su vez, también deben de aportar las necesidades específicas que requiera la aplicación para la que sean destinados. Inicialmente, durante el último tercio del siglo XX, los biomateriales eran esencialmente materiales industriales seleccionados con el criterio de que fueran capaces de cumplir ciertos requisitos de aceptabilidad biológica, sin embargo hoy en día muchos de estos son

diseñados, sintetizados y procesados con el único propósito de ser usados para aplicaciones en el campo médico (Rodríguez-Lugo, 2003).

Debido a que el tejido que compone el hueso es 60% hidroxiapatita (HA), este compuesto representa uno de los biomateriales más importantes, tanto comercial y como técnicamente hablando, para aplicaciones médicas (Rodríguez-Lugo, 2003).

Aunque el mineral del hueso tiene una composición variable, diversas apatitas imitando la evolución de hueso mineral en animales jóvenes y viejos pueden ser preparadas y su composición puede ser representada por formula química análoga a la del mineral del hueso (Xuejiang Wang, 2002).

En la actualidad, la hidroxiapatita se usa con fines médicos siendo utilizado como injerto o sustituto de hueso para ayudar a completar la reparación de una deficiencia esquelética debida a trauma, tumores o desarrollo anormal, y de esta manera restaurar la función normal del tejido (M. Teresa Irais Animas Torres, 2005).

Sin embargo, como en todo procedimiento quirúrgico, siempre existe la posibilidad de infección y la hidroxiapatita no es la excepción, por esta razón, es de gran interés encontrar un método para proporcionar propiedades antimicrobianas y así desarrollar un biomaterial compuesto, con la hidroxiapatita como base. Para nuestra investigación, se eligió la plata como el material que aporte las propiedades antimicrobianas a nuestro sistema compuesto.

La plata ha tenido diferentes aplicaciones a través de la historia, desde la economía mundial hasta su uso en la medicina como agente para evitar infecciones y tratar quemaduras (Miguel Monge, 2009). Se ha encontrado que el fosfato de plata posee diferentes tipos de propiedades como fotocatalíticas y bactericidas (Aiping Wu, 2013).

En base a lo anterior, resulta de gran importancia el desarrollo de nuevos biomateriales compuestos como la HA-Ag_3PO_4 para uso médico y de esta manera proporcionar una mejor calidad de vida para los pacientes que lo necesiten, en especial las personas de la

tercera edad que son los más susceptibles a fracturas y debilitamiento del hueso debido a la osteoporosis.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo se enfoca en la obtención del sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4 por método de precipitación a partir de nitrato de calcio, fosfato de amonio en medio acuoso y nitrato de plata. El trabajo de tesis se presenta de la siguiente manera:

En el capítulo uno, se muestran los antecedentes referentes al uso de los biomateriales en la actualidad, así como información general y características tanto de la hidroxiapatita, la plata y el fosfato de plata, así como introducción general sobre el estudio antimicrobianoy los microorganismos.

En el capítulo dos se expone el desarrollo experimental del proceso que se llevó a cabo desde el método de obtención del sistema HA-Ag_3PO_4, como la síntesis por separado de la hidroxiapatita y el fosfato de plata en sus formas puras. Se incluyen los métodos de caracterización utilizados como: difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopia electrónica de transmisión (TEM) y el análisis químico elemental (EDS), así como la descripción del estudio antimicrobiano que se realizó.

En el capítulo tres se presenta el análisis de los resultados, la discusión de los mismos y las conclusiones.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Hoy en día los biomateriales de todo tipo se utilizan para múltiples aplicaciones, desde apósito para heridas de tendón, hasta la reparación de ligamentos. Su extensa experimentación se ha llevado a cabo para identificar la composición, propiedades mecánicas, y la respuesta *in vivo* de biomateriales derivados naturalmente (J.C. Coburn and A. Pandit. 2007).

El hueso es un importante almacén de calcio, y es de especial importancia la región de la medula ósea que es donde se producen tres tipos de células de la sangre: células rojas, blancas y plaquetas (Tresguerres. 2003). La importancia de la preservación y reparación de los tejidos óseos ha estado presente desde la antigüedad, a través de la historia se han encontrado hallazgos arqueológicos que muestran los intentos de reemplazar dientes faltantes que se remontan a la época prehistórica, los materiales utilizados en ese entonces incluían conchas, corales, marfil (de colmillos de elefante), metales y cadáveres humanos y animales (Ring, M. E. 1985).

1.1 Biomateriales

Los biomateriales se pueden considerar como la mayor revolución terapéutica médica de los últimos treinta años, y aunque en principio se utilizaron para situaciones críticas, en la actualidad su uso clínico concierne a campos tan amplios que pueden ir desde la rehabilitación y el bienestar, hasta la conveniencia sanitaria y estética (F. Climent Montoliu).

Los biomateriales están destinados a su aplicación en seres vivos y para su fabricación se requiere la coordinación de expertos de diversos campos. El campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular avance en los últimos años y una motivación importante para ellos ha sido el hecho de que la esperanza y calidad de vida aumente de forma considerable. A su vez, tienen que aportar las prestaciones específicas que requiera la aplicación a la que vayan destinados. (María T. I., 2005)

Los biomateriales se han definido también como sustancias, descartando alimentos o drogas, contenidas en sistemas terapéuticos o de diagnóstico y, en algunos casos, han sido descritos como materiales compuestos de componentes biológicos, independientemente de su aplicación (R. Langer, 2004). Otra forma de definir a los biomateriales es que son "materiales de origen sintético, así como de origen natural, que están en contacto con fluidos biológicos como tejidos, sangre y con intención de ser utilizados para aplicaciones de prótesis, diagnóstico, terapéutico y de almacenamiento, sin afectar adversamente al organismo vivo y sus componentes" (Bruck, 1980) y "cualquier sustancia (excepto medicamentos) o combinación de sustancias, sintéticas o de origen natural, que se pueden usar por cualquier periodo de tiempo, como todo o parte de un sistema que trata, aumenta o remplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo" (Williams, 1987).

Los biomateriales han jugado un rol importante en el tratamiento de diferentes enfermedades. Un ejemplo claro ha sido que por más de dos mil años, los romanos, chinos y aztecas han utilizado diferentes biomateriales, como por ejemplo el oro para odontología. Es así como los biomateriales comenzaron a utilizarse con diferentes aplicaciones en la medicina (R. Langer, 2004).

1.2 Hidroxiapatita

Los fosfatos de calcio son los principales componentes del hueso, lo cuales poseen propiedades bioactivas y biocompatibles, y se han utilizado en un campo interdisciplinario de la ciencia que involucran la química, biología, medicina, odontología y geología por más de veinte años (Burcu C, Yavuz G, Nuray Y. 2008). La formación de diferentes tipos de fosfatos de calcio en ambos sistemas sintéticos y biológicos depende de la solución de pH, temperatura, y composición. En sistemas biológicos, así como en sistemas sintéticos, los fosfatos de calcio pueden transformarse de una morfología a otra dependiendo del pH y la composición de la solución sintética o biológica en su microambiente. (LeGeros, R. Z. 1999)

Antes de entender cuál es el comportamiento de la HA, sabemos que es un fosfato de calcio presente en tejidos estructurados con comportamiento complicado, por lo que es necesario entender de dónde proviene este interesante cristal. Todo empieza por el calcio. El calcio es un elemento con gran relevancia, no sólo para la estructura y el funcionamiento de los tejidos mineralizados, sino también acompañando la función integral de los seres vivos. Es un elemento esencial para la vida, entre sus funciones destacan la excitabilidad nerviosa, contracciones musculares, paso de sustancias a través de sus membranas, y actividad hormonal. En los humanos, el calcio ocupa el quinto lugar en importancia de los elementos que lo componen, abajo del sodio y del potasio, y es el tercer catión más importante en el espacio extracelular. El 99% del calcio en humanos se encuentra en huesos y dientes como parte de la HA, y el 1% se encuentra en el líquido extracelular (Tresguerres. 2003).

El tejido óseo de los animales vertebrados y del hombre está formado por 65% de fase inorgánica, la cual se asemeja en estructura al de la hidroxiapatita (HA), que es un biocerámico con la capacidad de unirse químicamente con el tejido óseo, haciéndola bioactiva (U. Gburecka, 2003), esto promueve su aceptación y adecuada osteointegración en el medio biológico (M.P. Staiger, 2006). Su similitud con el hueso, ha permitido que se convierta en una alternativa como sustituto óseo en diferentes tratamientos médicos (U. Gburecka, 2003).

La hidroxiapatita (HA) es un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo, oxígeno e hidrógeno, de acuerdo con la fórmula $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. La HA está presente en el cuerpo en dientes y huesos confiriéndoles su dureza característica. Este biocristal pertenece a la familia de las apatitas, basado en la similitud de los perfiles de difracción de rayos X con los de las apatitas (Smith Deanne, 2000) y sus similitudes en composición con otros materiales (principalmente iones de calcio y fosfato) (McConnell D. J. 1952). La estructura cristalina de la HA es de tipo hexagonal **(Fig. 1.1)**.

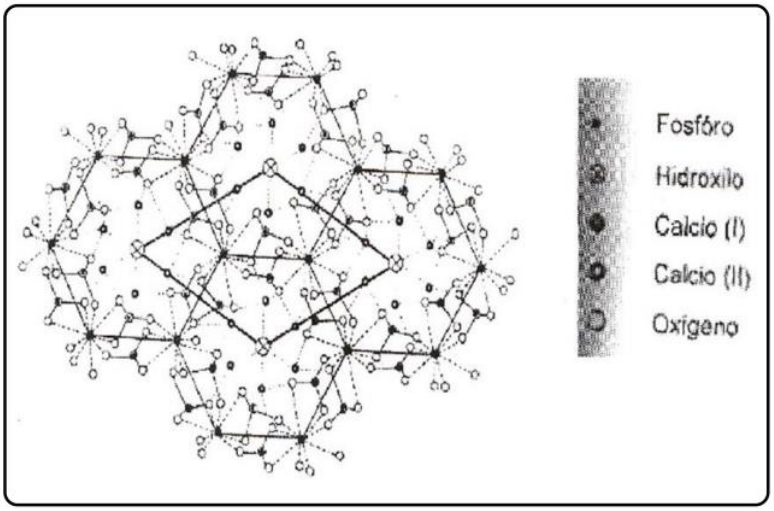


Fig 1.1 Arreglo atómico en la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita, mostrando las posiciones atómicas del Ca, P, O e H dentro de la celda unitaria.

En la naturaleza, las apatitas se pueden encontrar como parte de las rocas sedimentarias y metamórficas (Smith Deanne, 2000). Algunos de los fosfatos de calcio que se presentan naturalmente se encuentran: el fosfato de dicálcico dihidratado ($CaHPO_4 \bullet 2H_2O$, DCPD), fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$, TCP), fosfato tetracálcico ($Ca_4P_2O_9$, TetTCP), fosfato octacálcico ($Ca_8H_2(PO_4)_6$, OCP) y la hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, HA) (María T. I. Animas, 2005). En el caso de la HA natural se ha encontrado que contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso (Tresguerres. 2003). Las mezclas de hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP) son las más usadas para rellenar y remplazar hueso en implantes dentales, transportar productos orgánicos y como recubrimiento para implantes dentales (R. Legeros, S., 2003). Debido a las impurezas presentes en la hidroxiapatita natural, estas no son ideoneas para uso médico, sin embargo las hidroxiapatitas sintéticas, que se obtienen a partir de fosfatos dicálcicos y tricálcicos a través de un proceso de síntesis, ayudan al metabolismo del ser vivo en el cual se implanta (Solomon, P., 2001).

1.2.1 Métodos de obtención de Hidroxiapatita

En lo que respecta a su preparación, la hidroxiapatita puede ser obtenida a partir de esqueletos de animales o bien de manera sintética por medio de diferentes rutas de síntesis químicas; en este último caso pueden obtenerse materiales con diferentes

características físico-químicas y morfológicas controladas y con diversas ventajas, entre las que se pueden mencionar la alta pureza y composición homogénea, distribución monomodal y tamaños de partícula nanométricos (S. Ramesh, 2008) según las variaciones de condiciones de síntesis: temperatura, pH, presión, cantidad de agua, agitación y concentraciones de los precursores que influyen en su obtención. Estas variaciones le confieren características microestructurales diferentes, lo que lleva a marcadas diferencias en sus propiedades, y por lo tanto en su uso. (M. T. Irais Animas, 2005)

En la literatura, se han reportado distintos métodos para la síntesis de hidroxiapatita, entre los que se encuentran: el método sol-gel, micro emulsión, hidrotérmico, precipitación y el método de reacción en estado sólido etc. (Burcu C, 2008)

Sol-gel

El método de sol-gel es un método químico húmedo que no necesita un valor alto de pH (W. Fenga, 2005). El uso de este método permite conseguir recubrimientos con mayor homogeneidad debido a que los procesos de mezcla ocurren a escala nanoscópica, reduciéndose la temperatura de sintetización, debido al pequeño tamaño de partícula. Además, la versatilidad de los procesos sol-gel se pueden optimizar las condiciones de síntesis empleadas, de tal forma que los materiales resultantes presenten las propiedades específicas deseadas, que pueden ser elegidas de maneras tan distintas como para que el resultado final sea de un material de elevada superficie y porosidad específica **(Fig. 1.2)** (A. Jiménez-Morales, 2005).

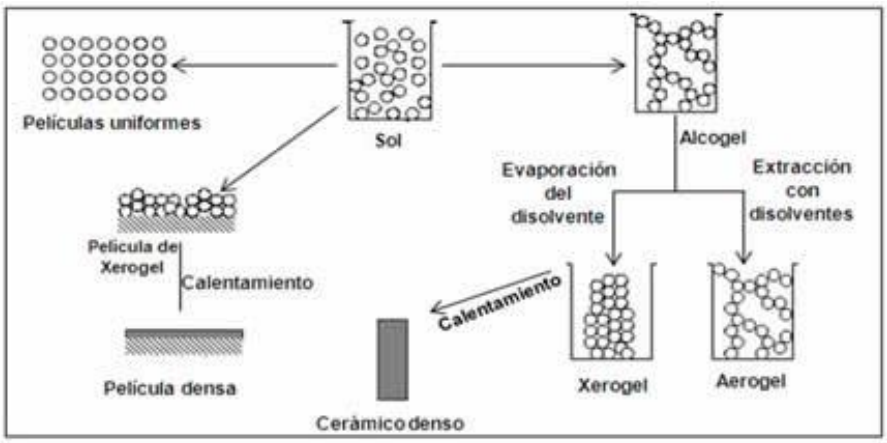


Fig. 1.2 Método sol-gel.

También, este método presenta múltiples ventajas, entre ellas, la alta pureza del producto (Wang Fenga, 2005). La técnica es muy utilizada en la preparación de muchos compuestos principalmente catalizadores, por sus múltiples beneficios. El principio químico del método se emplea con muchas variaciones en reactivos, solventes y temperatura (Perego, 1997).

El proceso sol-gel ofrece una mezcla molecular de calcio y fosforo. Además, la elevada reactividad de los polvos de sol-gel permite una reducción de la temperatura de procesamiento y de cualquier fenómeno de degradación durante la síntesis (María T. I. Animas, 2005). Existen reportes bibliográficos sobre el uso de este método en la síntesis de hidroxiapatitas y se presenta variedad en los reactivos de partida, pero lo más utilizados son el P_2O_5 y el $Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$, utilizando como solvente el etanol debido a que favorece la formación de una solución más estable (KIM, Seak, 2004; FENG, Wang, 2005; Rajabi-Kzamani, 2008). Otro factor bastante destacado es el tiempo de envejecimiento el cual afecta el crecimiento del cristal y favorece la aglomeración de partículas (Perego, 1997).

Microemulsión

El procesamiento para la técnica de microemulsión se ha utilizado con éxito para preparar nanopartículas de metales, óxidos, haluros, sulfuros, carbonatos, superconductores y recientemente en materiales biocerámicos. Un sistema de microemulsión inversa consiste

en pequeñas gotas acuosas de 5 a 20 nm de diámetro en una fase continua de aceite, la cual es ópticamente transparente. La reacción tiene lugar cuando dos gotas diferentes, que contienen los reactivos, chocan entre sí. Cada una de estas gotas actúa como un reactor nanométrico, formando partículas de tamaño nanométrico (George C K, 2003).

Hidrotérmico

La técnica hidrotérmica posee una excelente posibilidad para el procesamiento de materiales avanzados ya sea en monocristales en bulto, o partículas finas, o nanoparticulas. Las ventajas de esta tecnología hidrotérmica han sido discutidas en comparación con los métodos tradicionales de procesamiento de materiales (Masahiro Y. and Hiroyuki S. 1994).

El método hidrotérmico convencional ha probado ser una manera conveniente en la preparación de materiales, incluyendo sales, óxidos metálicos, etc., pero el control sobre la morfología es pobre (Yingjun W, 2006).

Los geles precursores de HA formados por el método de precipitación son dispersados en soluciones acuosas ajustadas a pH 10 y con agitación a 200°C por 10 horas. Por este tratamiento, las partículas de HA se transforman normalmente en prismas hexagonales de tamaño de 25 x 90 nm. Por otro lado, el tratamiento hidrotermal de precursores de partículas de HA a 140°C por 2 horas produce partículas de HA como agujas de 100-200 nm de longitud y Ca/P <1.67. Este tratamiento en presencia de ácido cítrico a 200°C por 3 horas proporciona partículas en fibras largas de 10-30 μm de longitud y 0.5 μm de diámetro (Masahiro Y., 1994).

Reacción en estado sólido

Las reacciones en estado sólido requieren elevadas temperaturas debido a la alta energía de activación que necesitan y la preparación de los reactivos en forma de polvo fino de manera que permita un íntimo contacto entre ellos. En el caso de hidroxiapatita, se sintetiza entre polvos que contengan iones Ca^{2+} y PO_4^{3-}, y la obtención de cuerpos densos

policristalinos se consiguen posteriormente por medio de un tratamiento térmico (Xiaoting Hong, Xiaohui Wu. 2012).

Las reacciones de estado sólido usualmente dan productos estequiométricos y bien cristalizados, pero requieren altas temperaturas y extensos tratamientos de calor. La habilidad de sinterización de los polvos es usualmente baja y al final resulta en bajas propiedades mecánicas de las matrices sintetizadas **(Fig. 1.3)** (Lin K. 2007).

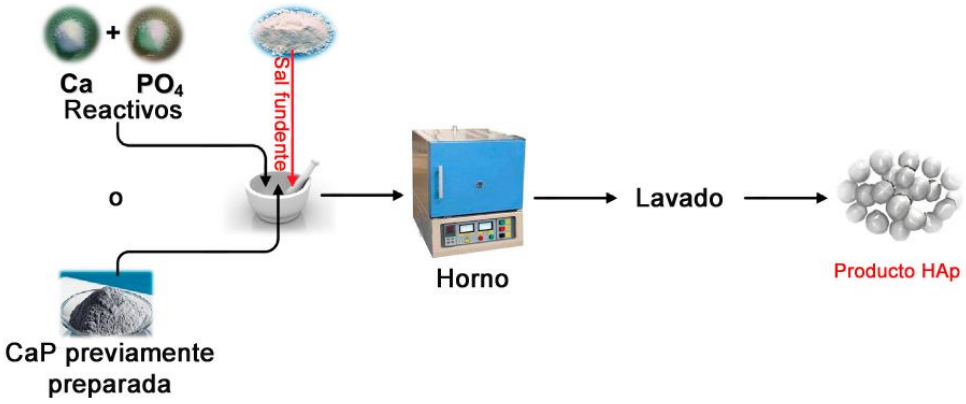


Fig. 1.3 Método de reacción del estado sólido.

Spray pirólisis

Partículas esféricas de HA son sintetizadas por spray pirólisis. La disolución de soluciones atomizadas de $Ca(NO_3)$ y $(NH_4)2HPO_4$ son evaporadas dentro de un horno, para descomponerse a 600°C. Las partículas de HA formadas son aglomerados huecos de partículas finas (Tatsuo Ishikawa. 2000).

Precipitación

El proceso de precipitación es el método más utilizado para la preparación de partículas de hidroxiapatita. Este proceso es simple, de bajo costo y sustentable para la producción industrial pero las partículas resultantes tienen una baja calidad con un tamaño grande de partícula con una distribución de amplia, y una gran cantidad de aglomerados (Burcu C., Yavuz G.). Dentro de los estudios realizados en este campo, se encuentran variaciones importantes en los pasos de preparación, los reactivos de partida y se ha estudiado la influencia de condiciones como pH, temperatura, concentración de los reactivos, orden de

adición de los mismos, etc. Los reactivos de partida son muy importantes cuando se desea obtener un producto puro, debe escogerse reactivos que no contengan iones que puedan ocupar o sustituir iones de la red, por ejemplo Na, K, Cl, Mg, esto dependiendo de las características que se quieran. La concentración de los reactivos de partida determina (J.C. Elliot, 1994; Seckler; Londoño, 2006) por variables importantes como la relación Ca/P utilizada (M. A. Giardina y M. A. Fanovich). Uno de los aspectos más importantes, que merecen especial atención es el pH, cuando se analiza las propiedades de las HA, se encuentra que estas tienen un pH de formación superior a 9 (J.C. Elliot, 1994; Seckler; Londoño, 2006), a valores inferiores se promueve la producción de otros fosfatos de calcio, por esta razón es necesario hacer la síntesis en medio básico.

Otro aspecto de gran valor, es el orden y velocidad de mezcla de los reactivos pues se ha encontrado que influyen grandemente en la nucleación de las HA, impidiendo la formación de fases intermedias, como fosfato cálcico amorfo (ACP) que afecten o contaminen el producto (Takash, 2006; Liptáková, 2000; Seckler; Rivero. R, 2007). En cuanto al efecto de la temperatura y tiempo de reacción, se encuentran algunas contradicciones sobre si afectan o no el proceso (Meilini, 2007; Miley, 2004). En general es arriesgado descartar o destacar la influencia de un parámetro aislado, la evaluación experimental permite aclarar la real importancia de cada uno **(Fig. 1.4)**.

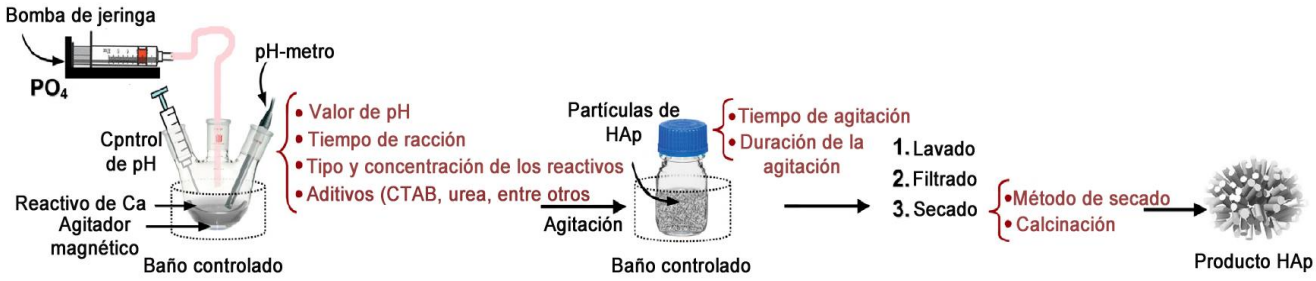


Fig. 1.4 Método por precipitación.

1.3 Problemática de los biomateriales con infecciones

Debido al envejecimiento de la población, cada vez son más necesarios dispositivos que permitan que los años de madurez y vejez se vivan de la mejor manera posible. Un

ejemplo de estos dispositivos son los empleados en el remplazo de hueso. Con la edad, el tejido óseo deja de renovarse y las fracturas se multiplican, por lo que son necesarios materiales capaces de cumplir con los requerimientos mecánicos y biológicos (Lourdes Amparo Vela R. 2012).

Los cirujanos se han esforzado para reparar el cuerpo humano, y para ello ha habido una necesidad de materiales para adaptarse a ese propósito. No es sorprendente que muchos de los primeros materiales utilizados para estos procedimientos eran de fuentes naturales como de origen animal o humano.

El uso de los biomateriales en la medicina moderna ha contribuido, que al ser implantados haya un riesgo importante de infección debido al procedimiento. Este incremento en la susceptibilidad a la infección parece estar presente en todas las clases de biomateriales, independientemente de la forma o la función y se ha mantenido a este día como uno de los problemas más comunes, todavía no resueltos asociados con el uso de biomateriales implantados. Con una sociedad que envejece, y el creciente uso de biomateriales que garantizan la restauración de la función y la calidad de vida (T. Fintan Moriarty, 2013), urge encontrar una solución a este problema.

El principal riesgo de las infecciones debido a implantes de biomateriales se deben al crecimiento de microorganismos sobre los mismos. El desarrollo y uso de las biomateriales sintéticos como dispositivos médicos y aplicaciones clínicas han sido expandidas dramáticamente durante el último medio siglo (Simchi A, 2011). El mercado de dispositivos médicos implantados se estima en más de $300 mil millones de dólares en todo el mundo, creciendo a una tasa del 20% anual (Chu PK , 2008. Zimmerli W , 2011. T. Fintan Moriarty, 2013). Teniendo en cuenta los aproximadamente cinco millones de personas con dispositivos médicos implantados en el 2010, se espera que este número se incremente dentro de los próximos 10 años debido a las innovaciones de dispositivos, el envejecimiento de la demografía de la población mundial, el aumento del acceso de dispositivos médicos en los países desarrollados y una mayor demanda de una mejor

calidad de vida del paciente ofrecido por muchos dispositivos médicos (T. Fintan Moriarty, 2013).

1.4 Plata

La plata ha sido utilizado desde tiempos inmemoriales en distintas formas como plata metálica, nitrato de plata, sulfadiazina de plata, etc., en especial para el tratamiento de quemaduras, heridas y varias infecciones bacterianas (Mahendra R, Alka Yadav, Aniket Gade. 2009). Desde el año 1000 a.C. la plata ha sido utilizada para mantener el suministro de agua de las ciudades potable (Richard et al., 2002; Castellano et al., 2007).

El nitrato de plata en su forma sólida ha sido conocido también por diferentes nombres como: "Lunar caustic" en inglés, "Lapis infernale" en latín y "Pierre infernale" en francés (Klasen, 2000). En 1700, el nitrato de plata se usó para el tratamiento de diferentes enfermedades como fistulas en glándulas salivales, hueso y abscesos perinales (Klasen, 2000; Landsdown 2002).

En el siglo XIX, el nitrato de plata fue usado para remover tejidos granulados, permitiendo la epitelización y promoviendo la formación de la costra sobre la superficie de las heridas. Variando las concentraciones, el nitrato de plata fue utilizado en el tratamiento de quemaduras al poco tiempo de haber ocurrido (Castellano et al., 2007; Klasen 2000).

En 1881, Carl S. F. Crede cura la oftalmía neonatal usando nitrato de plata en gotas. El hijo de Crede, B. Crede, diseñó recubrimientos impregnados de plata para injertos de piel (Klasen, 2000; Landsdown, 2002). En 1940, después de que se introdujera la penicilina, se usó la plata para tratamientos de infecciones bacterianas minimizadas (Hugo and Russell, 1982; Demling y DeSanti, 2001; Chopra, 2007). La plata aparece de nuevo en la escena médica en la década de 1960 cuando Moyer introdujo el uso de nitrato de plata al 0.5% para el tratamiento de quemaduras. Se propuso que esta solución no interferiría con la proliferación epidérmica y poseía la propiedad antibacteriana contra el *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Moyer et al., 1965; Bellinger y Conway, 1970). En 1968, el nitrato de plata fue combinado con sulfonamida en forma de

crema de sulfadiazina de plata que sirvió como un agente antibacteriano de amplio espectro y se utilizó para el tratamiento de quemaduras. La sulfadiazina de plata es efectiva contra bacterias como la *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* También posee algunas actividades antifúngicas y antivirales (Fox and Modak, 1974).

Recientemente, debido a la problemática emergente de bacterias resistentes a los antibióticos, los médicos han vuelto al uso de la plata, aplicando diferentes variaciones en el nivel de plata (Gemmell *et al.*, 2006; Chopra, 2007).

Las propiedades antimicrobianas de la plata están relacionadas con la cantidad de plata y la tasa de plata liberada. La plata en forma metálica es inerte pero reacciona con la humedad en la piel y los fluidos de la herida con la cual se ioniza. La ionización de la plata es altamente reactiva uniéndose al tejido de las proteínas y provocando cambios estructurales en la pared celular bacteriana y en la membrana nuclear que lleva a la distorsión y la muerte celular. La plata también se une al ADN y ARN bacteriano mediante la desnaturalización e inhibe la replicación bacteriana (Lansdown, 2002; Castellano *et al.*, 2007).

1.4.1 Fosfato de Plata

La morfología y estructura de los cristales de fosfato de plata (Ag_3PO_4) recientemente han atraído una considerable atención dado que pueden ser aplicados en biocompatibilidad, bacteriostática y el campo de la óptica (Q. H. Liang, Q. J. Ma, 2012; M. Zhang, J. K. Liu, 2010). También, la atención sobre los cristales de Ag_3PO_4 está enfocada sobre las emulsiones fotográficas (B. E. Jones, 1912) y coloración de plata (R. S. Taichman, 1992). Por ejemplo, Lee y sus colaboradores demostraron que los nanocristales de Ag_3PO_4 poseen propiedades bactericidas debido a la liberación lenta de iones Ag^+ (J. J. Buckley, 2010). Ye y sus colaboradores reportaron que los microcristales de fosfato de plata exhibían una excelente propiedad fotocatalítica (Z. G. Yi, 2010). La mayoría de los trabajos se concentran en la caracterización y el rendimiento de Ag_3PO_4 con morfologías

específicas (M. Zhang, 2010; B. E. Jones, 1912; Z. G. Yi, 2010; Y. P. Liu, 2012; I. Zohar, 2010).

Reportes han revelado que la transformación de la morfología (X. G. Ma, 2011; P. Chen, 2007) es un método efectivo para el diseño multifuncional de los cristales, pero este método de síntesis de morfología controlado es difícil debido a la sustancia química intrínseca y las propiedades físicas de los materiales originales (P. Chen, H. W. Liang, 2011; Y. J. Zhan, 2008). Por lo tanto, el control y transformación de las morfologías sigue siendo un campo de investigación importante y desafiante. En este trabajo se controló la preparación de los cristales de Ag_3PO_4 con diferentes morfologías como el dodecaedro rómbico y cubico que son obtenidas a partir de la síntesis por el método de precipitación en medio acuoso con condiciones a temperatura~~s~~ ambiente~~s~~. Al mismo tiempo, la relación entre la morfología, la actividad fotocatalítica y bacterioestática de los cristales de Ag_3PO_4 que se han mencionado en este trabajo. Además, nuestra investigación demostró que aparecen algunos poros sobre la superficie de los cristales de Ag_3PO_4 los cuales hicieron una mayor contribución a la actividad foto catalítica y a la actividad bacteriostática (Y. J. Zhan, 2008).

1.5 Microorganismos

Los microbios, también denominados microorganismos, son seres vivos diminutos que individualmente suelen ser demasiado pequeños para ser observados a simple vista. El grupo incluye las bacterias, los hongos, los protozoos y las algas microscópicas. También incluye los virus, entidades no celulares que a veces se consideran en el límite entre lo vivo y lo inerte.

Existe una tendencia a asociar estos microorganismos sólo con enfermedades importantes como el SIDA, infecciones desagradables o inconveniencias frecuentes como el deterioro de los alimentos. Sin embargo, la mayoría de ellos realizan contribuciones fundamentales al bienestar de los habitantes del mundo porque ayudan a mantener el equilibrio de los organismos vivos y sustancias químicas en nuestro ambiente (Gerard J. Tortora, 2007).

1.5.1 Clasificación de los microorganismos

Antes de que se conociera la existencia de los microbios todos los organismos se agrupaban en el reino animal o en el reino vegetal. Cuando se descubrieron los organismos microscópicos con características de animales o vegetales a fines del siglo XVII fue necesario desarrollar un nuevo sistema de clasificación pero los biólogos no pudieron ponerse de acuerdo hasta fines de la década de 1970.

En 1978 Carl Woese creó un sistema de clasificación basado en la organización celular de los organismos. En este sistema todos los organismos se agrupan en tres dominios, a saber:

1. Bacterias (las paredes celulares contienen un complejo de proteína-hidrato de carbono denominado peptidoglucano)).
2. Archaea (sus paredes celulares, si están presentes, carecen de peptidoglucano).
3. Eukarya, que incluye:
   3.1 Protistas (moho mucosos, protozoos y algas).
   3.2 Hongos (levaduras unicelulares, moho multicelulares y setas [champiñones]).
   3.3 Vegetales (incluye musgos, helechos, coníferas y plantas con floración).
   3.4 Animales (incluye esponjas, parásitos, insectos y vertebrados).

Bacterias

Las bacterias son microorganismos con una célula única (unicelulares) relativamente simples. Dado que su material genético no está encerrado por una membrana nuclear especial, las células bacterianas se denominan procariontes, de las palabras griegas que significan prenúcleo. Los procariontes incluyen a las bacterias y Archaea.

Las células bacterianas suelen presentar una de diversa formas. La forma de bastón de los *bacilos*, ilustrados en la **figura 1.6**, la forma esférica u oval de los *cocos* y la forma de tirabuzón o curva de lo espirilos son las más comunes, pero algunas bacterias presentan formas estrelladas o cuadradas. Las bacterias individuales pueden formar pares, cadenas,

racimos u otros agrupamiento; estas formaciones suelen ser características de un género o especie de bacteria particular.

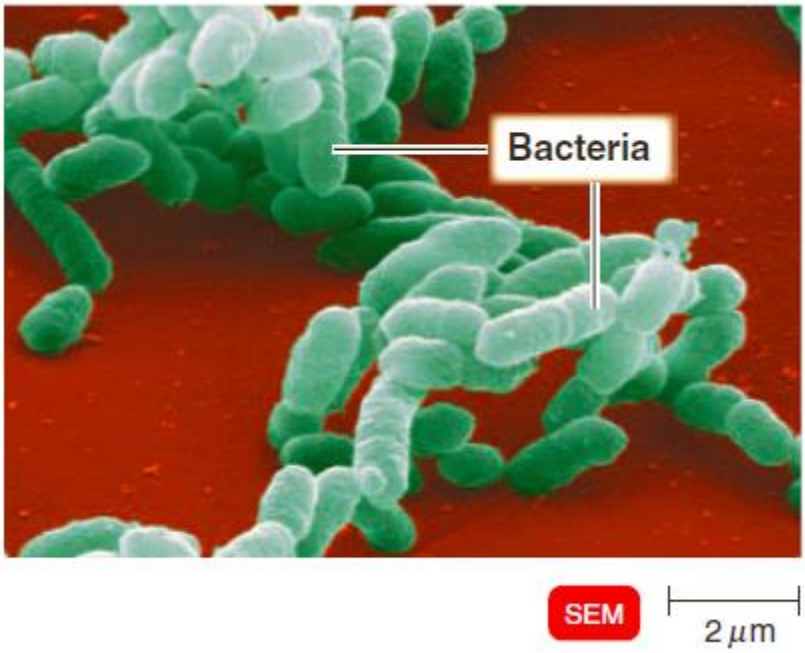


Fig. 1.6 Bacterias con forma de bastón *Haemophilus influenzae*, una bacteria de las causas bacterianas de neumonía.

Las bacterias están recubiertas por paredes celulares que en gran parte están constituidas por un complejo de hidrato de carbono y proteína denominado *peptidoglucano*, al contrario de lo que sucede en las paredes celulares de las plantas y las algas, cuya sustancia principal es la celulosa. Las bacterias suelen reproducirse mediante la división en dos células iguales; este proceso se conoce como fisión binaria. Para la nutrición la mayoría de las bacterias utilizan sustancias químicas orgánicas, que en la naturaleza puede provenir de organismos muertos o vivos. Algunas bacterias pueden producir su propio alimento mediante la fotosíntesis y algunas pueden nutrirse a partir de sustancias inorgánicas (Gerard J. Tortora, 2007).

Archea

Como las bacterias, los miembros de Archaea están formadas por células procariontes pero si tienen paredes celulares, estas carecen de peptidoglucano. Estos microorganismos, que en general se encuentran en ambientes extremos, se dividen en

tres grupos principales. Los metanógenos producen metano como producto de desecho a partir de la respiración. Los halófilos extremos (halo= sal; philia= afinidad) viven en ambientes extremadamente salinos como en el Gran Lago Salado y el Mar Muerto. Los termófilos como las de las fuente termales del Parque Nacional Yellowstone. Estos microorganismos no causan enfermedades conocidas en los seres humanos (Gerard J. Tortora, 2007).

Hongos

Los hongos son eucariontes, es decir organismos cuyas células poseen un núcleo diferenciado que contiene el material genético (DNA) de la célula, rodeado por una cubierta especial denominada membrana nuclear. Los organismos del reino Fungi pueden ser unicelulares o multicelulares. Los hongos multicelulares grandes, como las setas, pueden asemejarse a las plantas, pero a diferencias de estas, no tienen capacidad de fotosíntesis. Los hongos verdaderos tienen paredes celulares compuestas sobre todo por una sustancia denominada quitina. Las formas unicelulares de los hongos, las levaduras, son microorganismos ovales más grandes que las bacterias. Los más típicos son los hongos filamentosos largos (hifas) que se ramifican y entrelazan. Los crecimientos algodonosos que algunas veces se observan en el pan y en la frutan son micelios de hongos filamentosos **(fig. 1.7)**. Los hongos se reproducen de forma sexual o asexual. Obtienen su nutrición mediante la absorción de soluciones de materia orgánica de su entorno, sea del suelo, del agua salada, del agua dulce o de un huésped animal o vegetal (Gerard J. Tortora, 2007).

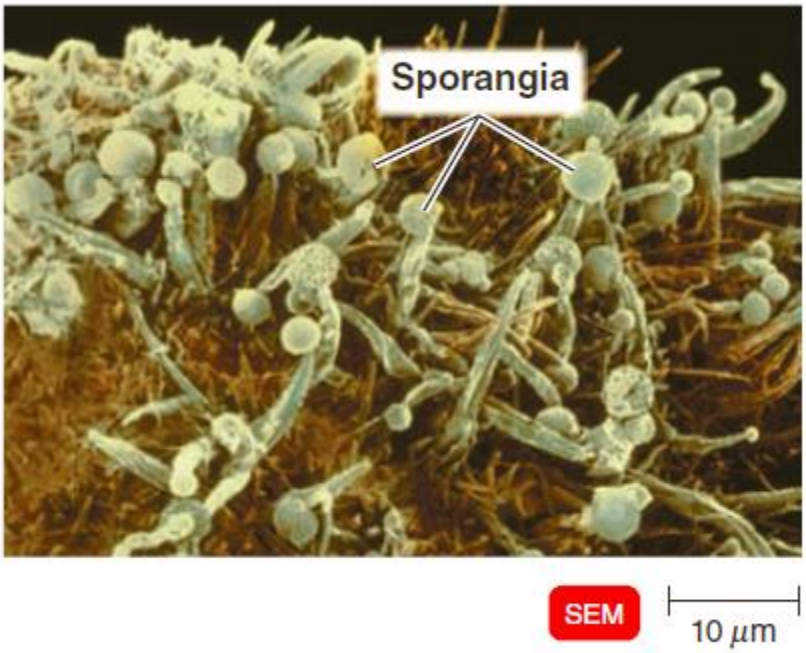


Figura 1.7 *Mucor*, un moho común del pan. Cuando se liberan de los eporangios (estructuras redondas), las esporas que se depositan en una superficie favorable germinan en una red de hifas (hebras) que absorben nutrientes.

Protozoos

Los protozoos son microorganismos eucariontes unicelulares que se mueven por medio de seudópodos, flagelos o cilios. Las amebas **(fig 1.8)** se desplazan por medio de extensiones de su citoplasma denominadas seudópodos (pies falsos). Otros protozoos poseen flagelos largos o numerosos apéndices más cortos para la locomoción conocidos como cilios. Se trata de microorganismos que presentan una diversidad de formas y viven como entidades libres o como parásitos (organismos que se alimentan de huéspedes vivos) que se absorben o ingieren compuestos orgánicos de su ambiente. Los protozoos pueden reproducirse de forma sexual o asexual (Gerard J. Tortora, 2007).

Figura 1.8 *Ameba*, un protozoo, que se aproxima a una partícula de alimento.

Algas

Las algas son eucariontes fotosintéticos con una amplia variedad de formas y reproducción sexual y asexual **(fig 1.9)**. Las algas de interés para los microbiólogos suelen ser las unicelulares. Las paredes celulares de muchas algas, como las de las plantas, están compuestas por hidrátos de carbonos denominado celulosa. Las algas abundan en agua salada y dulce, en el suelo y en asociación con plantas. Como fotosintetizadoras las algas necesitan luz, agua y dióxido de carbono para la producción de alimentos y para el crecimiento, pero por lo general no requieren compuestos orgánicos del ambiente. Como resultado de la fotosíntesis las algas producen oxígeno e hidratos de carbono, que luego son utilizados por otros organismos, incluidos los animales. Por lo tanto, desempeñan una función importante en el equilibrio de la naturaleza.

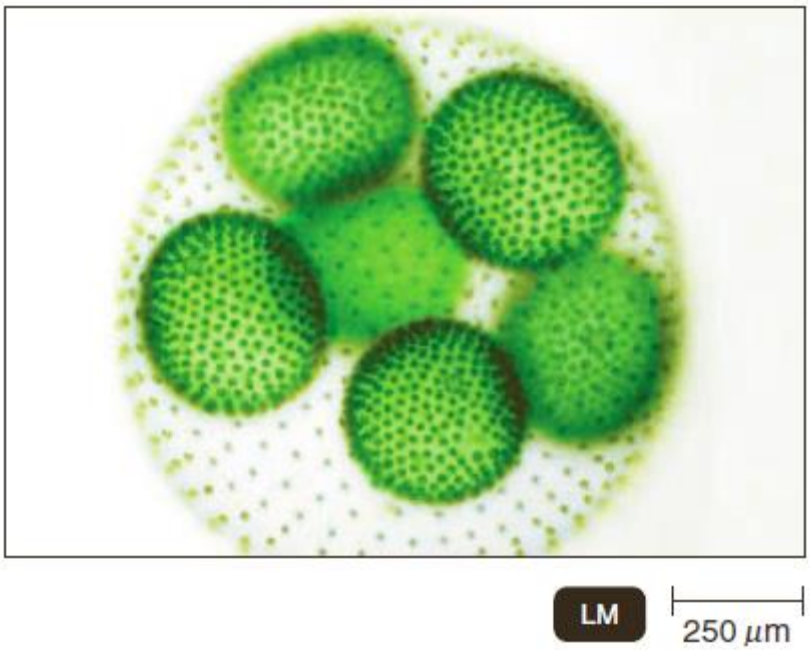


Figura 1.9 Alga de laguna, *Volvox*.

Virus

Los virus **(fig. 1.10)** son muy distintos de los otros grupos de microorganismos mencionados aquí. Son tan pequeños que solo pueden visualizarse con un microscopio electrónico y son acelulares (carecen de estructura celular). La estructura de una partícula viral es muy simple, dado que consiste en un "core" (centro) formado pr un solo tipo de ácido nucleico, DNA o RNA. Este core está rodeado por una cubierta proteica. Algunas veces la cubierta está revestida por una capa adicional, una membrana lípidica denominada envoltura. Todas, las células vivas poseen RNA y DNA, pueden llevar a cabo reacciones químicas y pueden reproducirse como unidades autosuficientes. Los virus sólo pueden reproducirse si utilizan la maquinaria celular de otros organismos. Por lo tanto, se considera que son formas vivas cuando se multiplican dentro de las células que infectan. En este sentido los virus son parásitos de otros organismos. Por otra parte, cuando los virus se encuentran fuera de los huéspedes vivos, son inertes (Gerard J. Tortora, 2007).

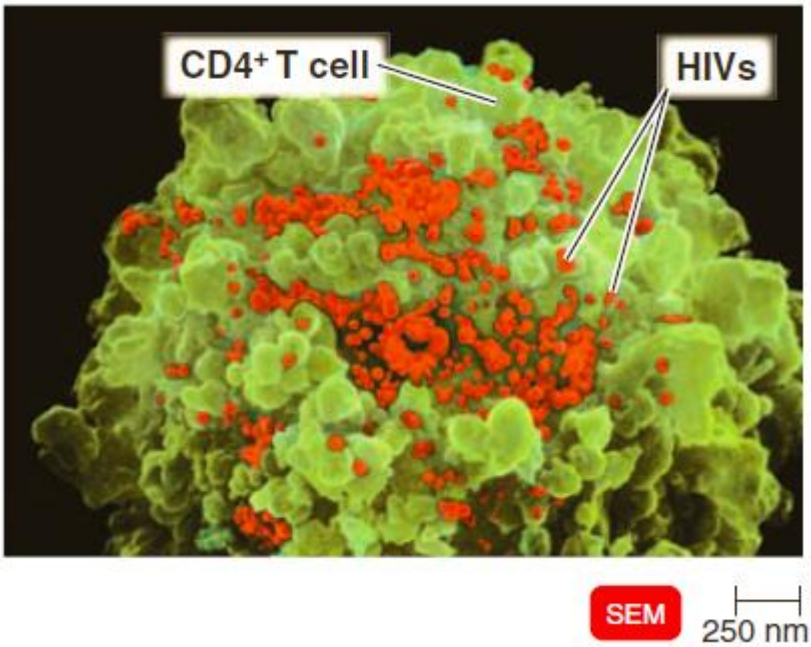


Figura 1.10 Varios virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el agente causal del SIDA, cuando brotan de un linfocito CD4.

1.6 Pruebas antimicrobianas

Las distintas especies y cepas de microorganismos presentan grados de sensibilidad distintos a los antimicrobianos. Además, la sensibilidad de un microorganismo puede cambiar con el tiempo, incluso durante el tratamiento con un fármaco especifico.

Pueden utilizarse varias pruebas para indicar cuál es el agente antimicrobiano con más probabilidades de combatir un patógeno específico, como el método de Kirby-Bauer o la prueba de disolución en caldo.

Sin embargo, si se ha identificado el microorganismo, puede seleccionarse ciertos fármacos sin realizar el antibiograma. Las pruebas solo son necesarias cuando la sensibilidad no es predecible o cuando aparecen problemas de resistencia a los antibióticos (Gerard J. Tortora, 2007).

1.6.1 Método de Kirby-Bauer

La técnica más utilizada también conocido como antibiograma por difusión, también conocido como método de Kirby-Bauer **(fig.1.5)**. Se inocula ("se siembra") la superficie de una placa de Petri con agar de manera uniforme con una cantidad estandirizada de microorganismo de prueba. A continuación se coloca sobre la superficie del agar solidificado discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los agentes antimicrobianos. Durante la incubación los antimicrobianos se difunden por el agar desde los discos. Cuanto más lejos del disco se difunde el agente menor es su concentración. Si el antimicrobiano es eficaz se forma un halo de inhibición alrededor del disco después de un periodo de incubación estandarizado. Se mide el diámetro de ese halo; en general, cuanto mayor es el diámetro más sensible es el microorganismo al antibiótico. El diámetro del halo se compara con una tabla de referencia para ese fármaco y esa concentración y se informa si el microorganismo es sensible, medianamente sensible o resistente al antimicrobiano. Sin embargo, en el caso de un fármaco de poca solubilidad el halo de inhibición que indica que el microorganismo es sensible será más pequeño que el fármaco que es más soluble y sea difundido más ampliamente.

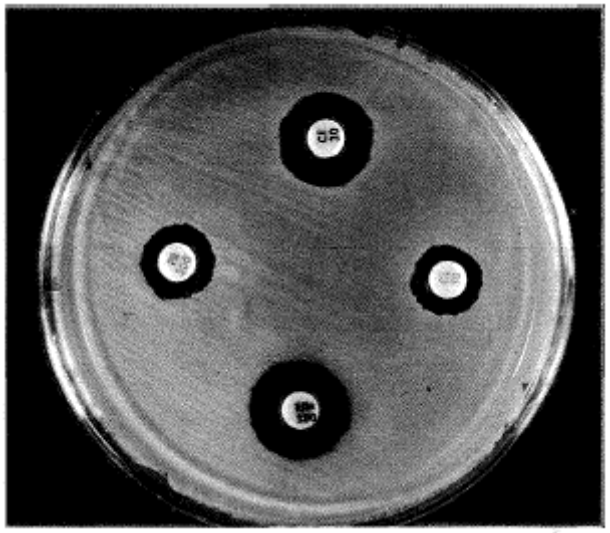


Fig. 1.5 Antibiograma por difusión para determinar la actividad de los antimicrobianos. Cada disco contiene un agente antimicrobiano diferente que se difunde en el medio circundante. Los halos claros indican inhibición del crecimiento de los microorganismos sembrados sobre la superficie del agar.

La prueba es simple y económica y es la utilizada con más frecuencia cuando no se dispone de instalaciones de laboratorio más sofisticadas (Gerard J. Tortora, 2007).

1.6.2 Prueba de dilución en caldo

Un inconveniente del antibiograma por difusión es que no determina si un fármaco es bactericida y no solo bacteriostático. La realización de las pruebas de dilución suele ser sumamente automatizada. Los fármacos se adquieren ya diluidos en caldo, en pocillos formados en una placa de plástico. Se prepara una suspensión del microorganismo en estudio y se la inocula simultáneamente en todos los pocillos mediante un dispositivo de inoculación adecuado. Tras la incubación se lee de modo visual la turbidez, aunque los laboratorios clínicos con gran volumen de muestras suelen leer las placas con lectores especiales que ingresan los datos en un ordenador.

Estas pruebas tienden a variar con el fármaco y no siempre son adecuadas para los laboratorios más pequeños (Gerard J. Tortora, 2007).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

A continuación se presenta la metodología empleada para llevar a cabo la síntesis de: la hidroxiapatita-Ag_3PO_4 , hidroxiapatita y Ag_3PO_4 puros, por el método de precipitación. De igual manera, se describen los equipos de caracterización utilizados para el estudio de las muestras obtenidas.

2.1 Síntesis de hidroxiapatita a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio en solución acuosa

La reacción global que se llevó acabo en la síntesis de hidroxiapatita fue la siguiente:

$$\mathbf{10\ Ca(NO_3)_2 \bullet 4\ H_2O + 6\ (NH_4)_2HPO_4 + 8\ NH_4OH \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20\ NH_4NO_3 + 46\ H_2O} \quad \mathbf{(2.1)}$$

Tomando en cuenta la reacción anterior, se preparó una solución acuosa de nitrato de calcio (0.042 M) a la que se adicionó una solución de fosfato de amonio (0.025 M) cumpliendo con la relación estequiométrica Ca/P de 1.67.

Una vez que se vertió por completo el fosfato de amonio en las tres muestras, se fijó el pH a 9 respectivamente con hidróxido de amonio.

La temperatura de reacción se mantuvo a 90°C por un tiempo de tres horas con agitación constate y después sin contacto con alguna fuente de calor durante 12 horas.

La reacción se llevó a cabo en un matraz de 3 bocas a baño maría con aceite de vegetal. En una boca lateral se le colocó un refrigerante de rosario con el propósito de condensar el vapor generado por la ebullición. La solución de calcio se colocó en el seno del matraz y la solución de fosfato y de hidróxido de amonio se vertió por la boca central, mientras que se monitoreo el pH. En la **figura 2.1** se tiene un diagrama del proceso que se llevó a cabo para la obtención de la muestra en forma de polvo a partir de la síntesis

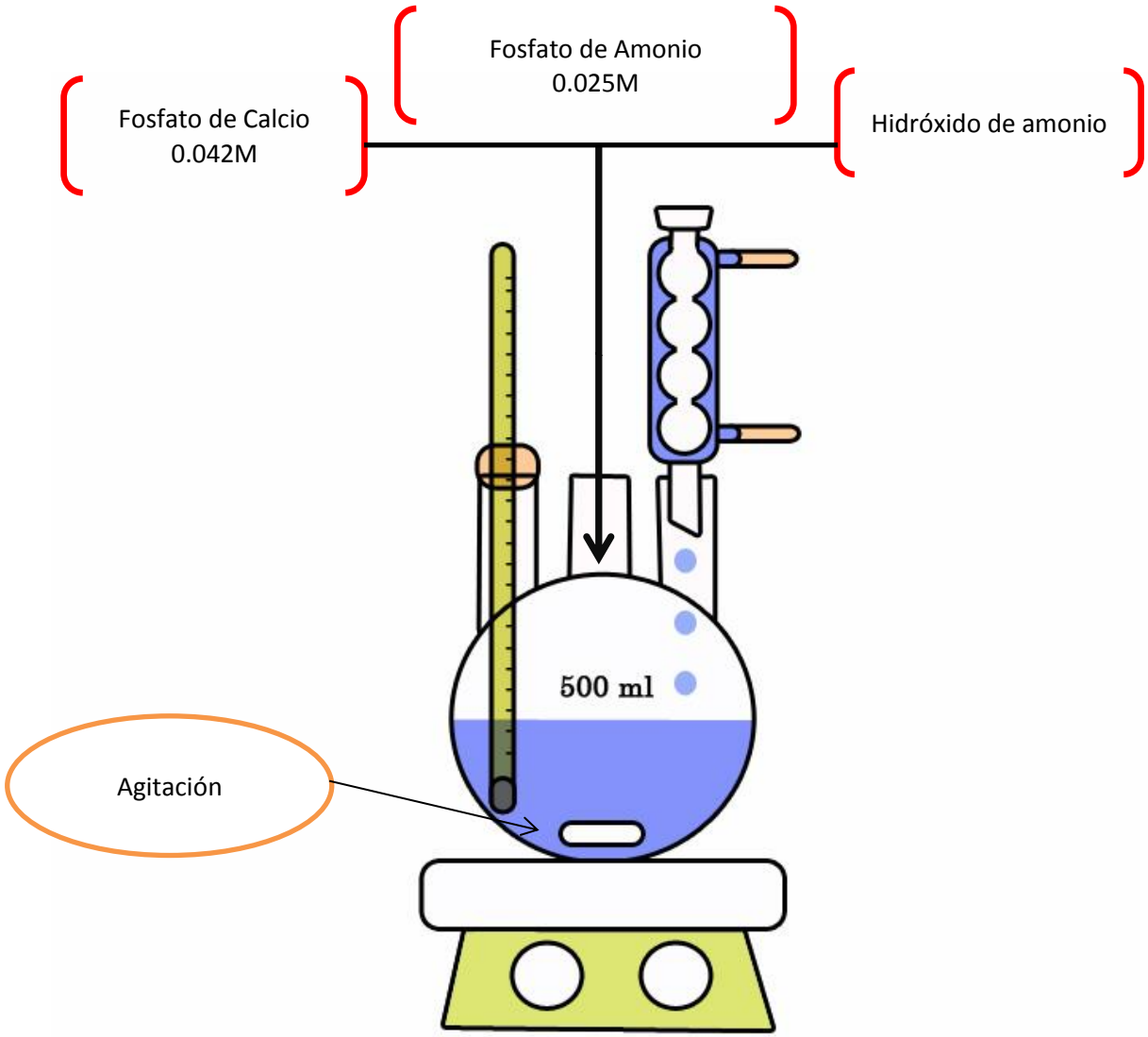


Fig. 2.1 Diagrama del proceso de obtención de hidroxiapatita a partir del método de precipitación.

Para promover la cristalinidad y el crecimiento de las partículas por sinterización, el material se colocó después de haber sido filtrado en una capsula de porcelana y en un horno a 80°C, se dejó reposar por un periodo de 24 h. Posteriormente, se analizó por diferentes métodos de caracterización de materiales.

2.2 Síntesis de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 a partir de nitrato de calcio, fosfato de amonio en solución acuosa y nitrato de plata

La reacción global que se llevó acabo en la síntesis de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 fue la siguiente (2.2) y (2.3):

$$10\ Ca(NO_3)_2 \bullet 4\ H_2O + 6(NH_4)_2\ HPO_4 + 8NH_4OH \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20\ NH_4NO_3 + 46H_2O \quad (2.2)$$

$$(NH_4)_3PO_4 + 3\ AgNO_3 \rightarrow Ag_3PO_4 + 3\ NH_4NO_3 \quad (2.3)$$

Tomando en cuenta las reacciones anteriores, se preparó inicialmente una solución acuosa de nitrato de cálcio (0.097M) y otra solución acuosa de fosfato de amonio (0.057M) cumpliendo con la relación estequiometria Ca/P de 1.67.

Las soluciones de nitrato de calcio y fosfato de amonio se colocaron en el seno del matraz y se les adiciono una solución a diferentes concentraciones de nitrato de plata entre cada síntesis.

La reacción se llevó a cabo en un matraz de bola de tres bocas a baño maría con aceite vegetal. En la boca lateral se colocó un refrigerante de rosario, con el propósito de condensar el vapor generado por la ebullición. Se monitoreo la temperatura de la reacción a través del uso de un termómetro.

Al calentar y alcanzar una temperatura de aproximadamente 90°C, se vertió 100 ml de hidróxido de amonio para fijar el pH a 11. Se mantuvo la temperatura constante durante un tiempo de tres horas con agitación constante y vigorosa, pasado el tiempo de reacción, se destapó el matraz para permitir que descendiera el pH a 8, manteniendo la temperatura constante a 90°C, de 1 a 2 horas. Al terminar, se dejó la solución en agitación sin contacto con alguna fuente de calor, aproximadamente 12 h.

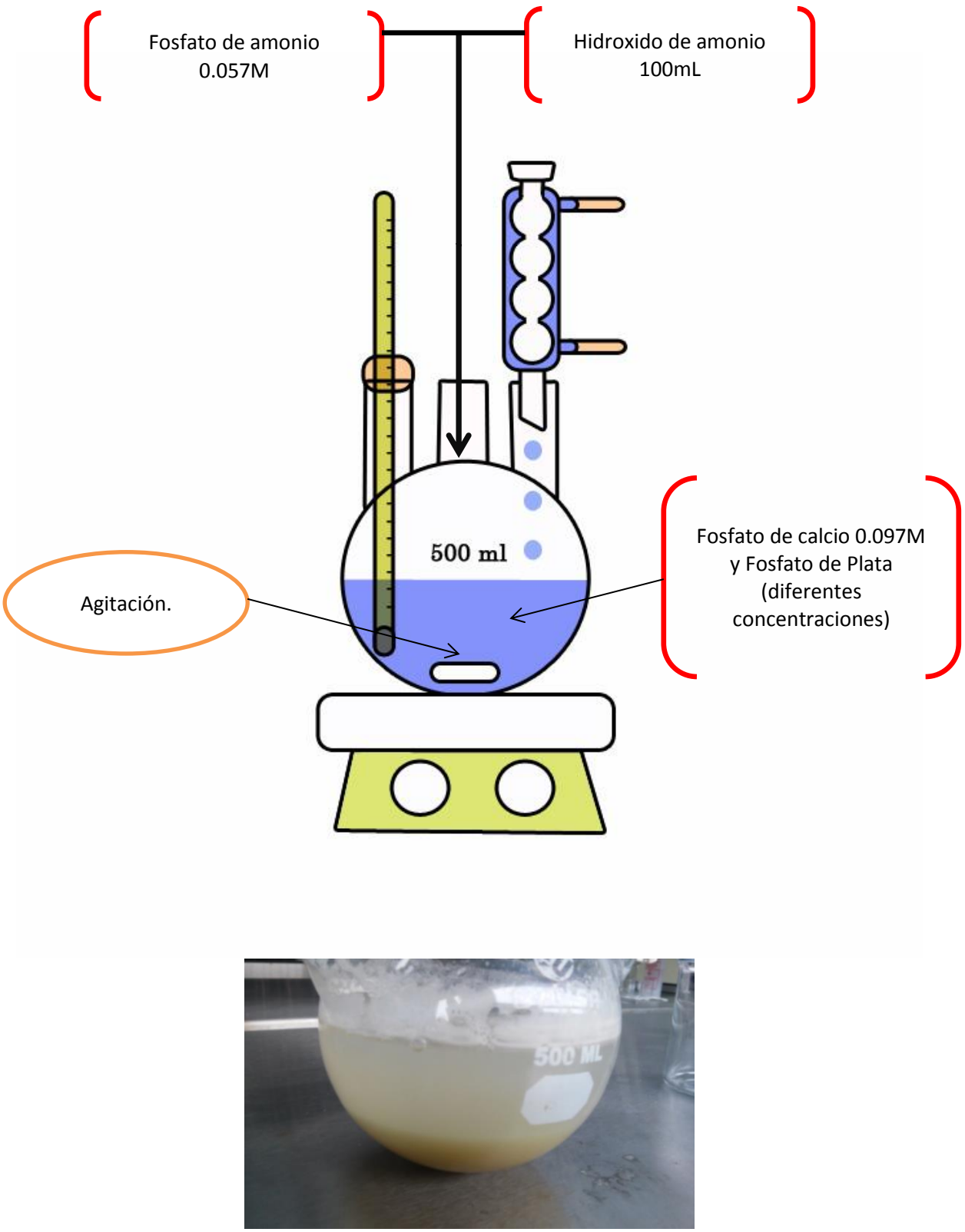


Figura 2.2 Diagrama del proceso de obtención de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 a partir del método de precipitación.

En la **figura 2.2** se muestra el seno del matraz con el producto de la reacción, en esta imagen es posible apreciar partículas finas que se mantiene en el fondo del matraz y un diagrama del proceso.

Para fomentar la cristalinidad y crecimiento de las partículas, las muestras, después de haber pasado por un proceso de filtrado, se colocaron en una capsula de porcelana y luego en un horno a una temperatura de 80°C por un periodo de 24 h, posteriormente se analizaron por diferente método de caracterización.

2.3 Síntesis de Ag_3PO_4 a partir de nitrato de plata y fosfato de amonio en solución acuosa

La reacción global que se llevó acabo en la síntesis de Ag_3PO_4 fue la siguiente:

$$(NH_4)_3PO_4 + 3\ AgNO_3 \rightarrow Ag_3PO_4 + 3\ NH_4NO_3 \quad (2.4)$$

Tomando en cuenta la reacción anterior, se preparó una solución acuosa de nitrato de plata (0.016 M) a la que se adiciono una solución de fosfato de amonio (0.057 M). La reacción se llevó a cabo en un matraz de tres bocas al cual se le coloco un refrigerante de rosario con el propósito de condensar el vapor generado por la ebullición, mientras que se controló la temperatura con ayuda de un termómetro.

La temperatura de reacción se mantuvo a 80°C durante 2 horas, y después se mantuvo a temperatura ambiente, dejándolo en agitación por aproximadamente 12 h. Al finalizar la síntesis se filtró cuidadosamente y lo obtenido se secó en un horno a 80°C durante alrededor 12 h. En la **figura 2.3** se muestra un pequeño diagrama del proceso que se llevó a cabo.

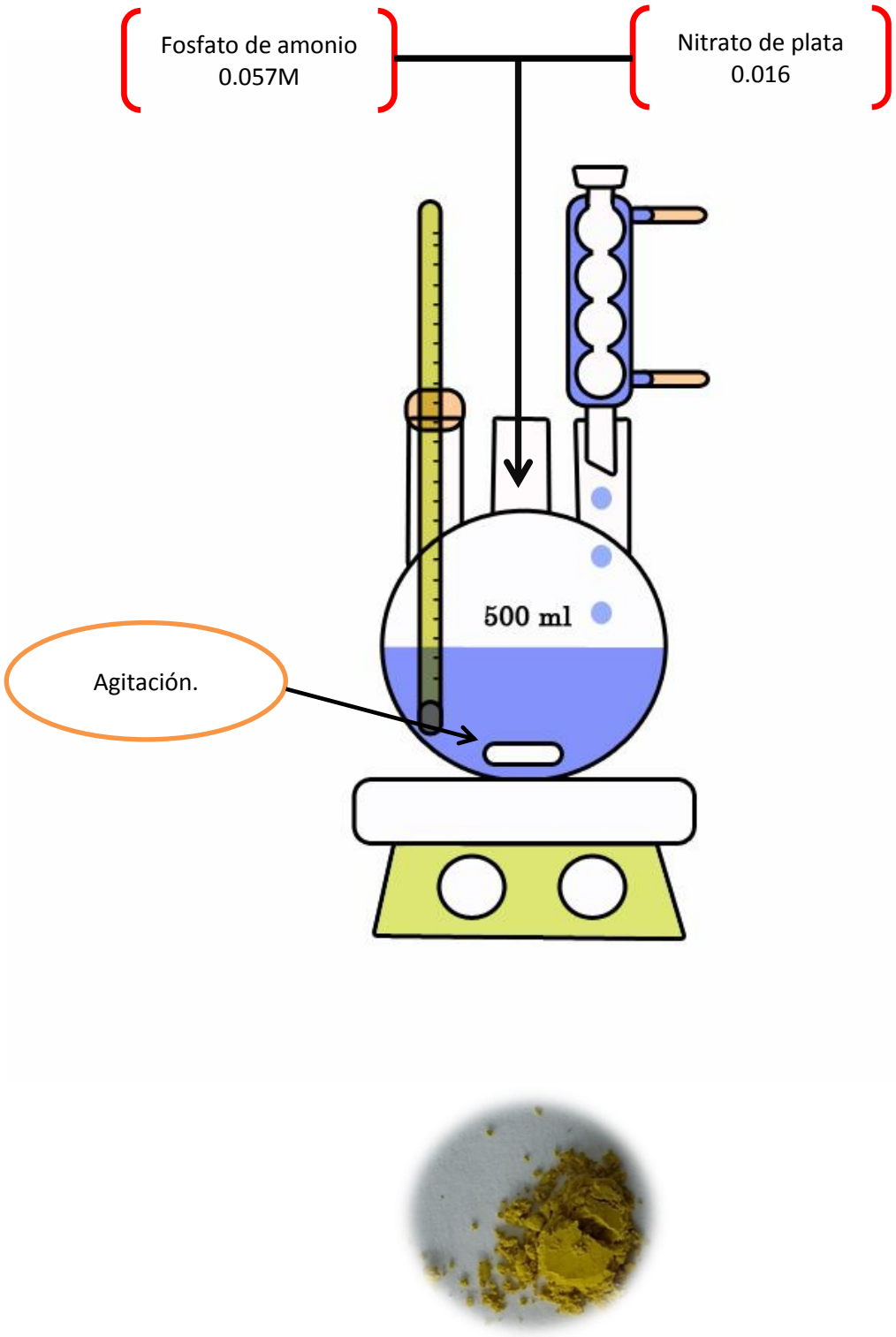


Figura 2.3 Diagrama del proceso de obtención de Ag_3PO_4 a partir del método de precipitación.

2.4 Técnicas de caracterización

Las muestras se caracterizaron por microscopia electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos X (DRX), espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDS) y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (MET). Las condiciones de operación de los equipos se describen a continuación

2.4.1 Microscopia electrónica de barrido

Para la caracterización microestructural del material, se utilizó un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío marca Jeol, modelo JSM-6610LV, equipado con una sonda de dispersión de energía de rayos X (EDS), marca Oxford **(fig. 2.4)**. La microscopia electrónica de barrido (SEM) consiste en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra, siempre y cuando dicha muestra sea conductora, en el caso de no ser conductora se recubre con una capa fina de oro o carbón, lo que le otorga propiedades conductoras.

Por último el detector de energía dispersiva detecta los rayos X generados que permiten realizar un análisis espectrográfico de la composición de la muestra (EDS).

Esta técnica se utilizó para observar la topografía, así como el tamaño de grano y su composición de las partículas obtenidas.

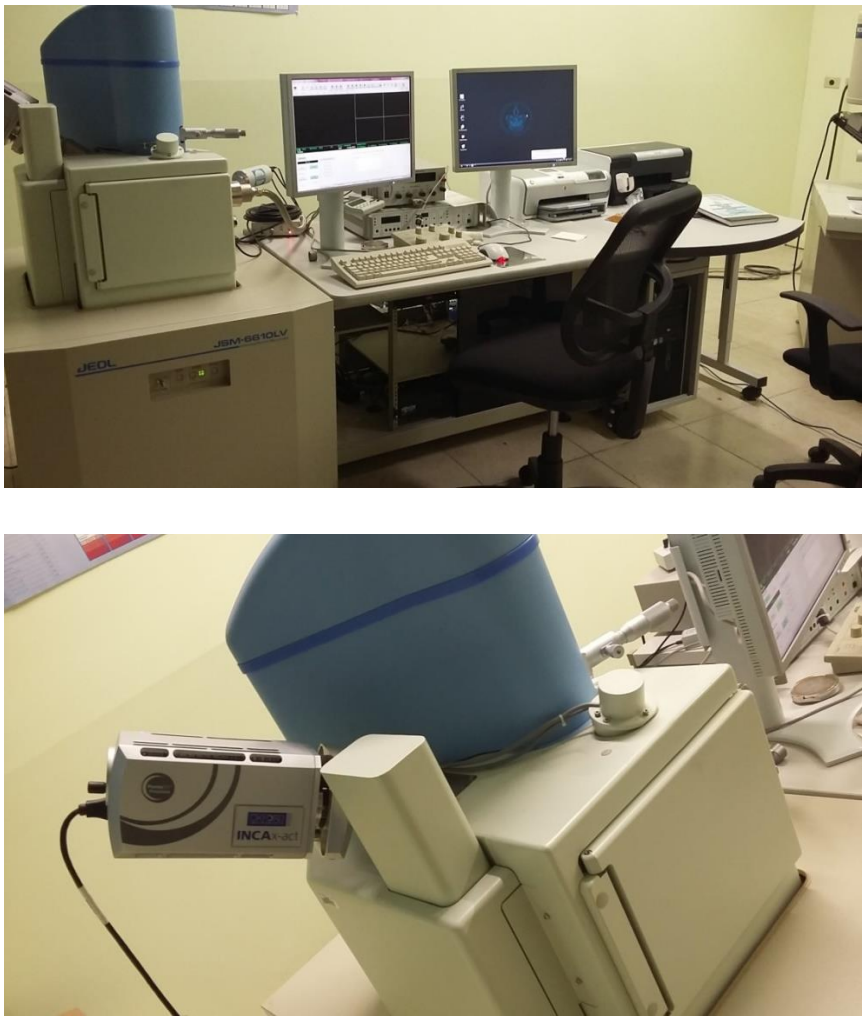


Figura 2.4. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La preparación de las muestras para su caracterización a través de microscopía electrónica de barrido de bajo vacío fue la siguiente: las muestras base, como la hidroxiapatita pura y el fosfato de plata puro, se molieron en un mortero de ágata. Una pequeña cantidad se colocó sobre cinta de carbono que fue adherida sobre stubs de aluminio, los cuales a su vez se colocaron en un porta muestra y se introdujeron a la cámara de vacío para análisis.

Para la preparación de las muestras obtenidas a partir de la síntesis del sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4, los polvos obtenidos fueron molidos en un mortero de ágata hasta obtener partículas finas de la cual se tomó una pequeña cantidad y se colocaron en viales de aproximadamente 1.5 ml y se les adiciono 1 ml de etanol. Posteriormente, los viales se introdujeron en un baño ultrasónico (Ultrasonic cleaner, modelo AS5150B, marca Auto

science) a una potencia media durante un tiempo 10 minutos. Después se tomó una alícuota de cada una de las muestras colocándolas en la superficie de los stubs permitiendo que se evapore el etanol, esto se hizo con la intención de poder observar partículas dispersas. Finalmente, se introdujeron a la cámara de vacío para el análisis.

2.4.2 Difracción de Rayos X

Las fases cristalinas del material se identificaron por difracción de rayos X con un difractómetro de rayos X para polvos marca Bruker modelo D8 Discover **(fig. 2.5)**. Las muestras se ensayaron de 20° a 80° grados para 2θ con un tamaño de paso 0.04° con una potencia de 40.0 kV y 40.0 mA amperaje.

El material previamente molido en un mortero de ágata, se colocó en un porta muestra metálico con una cavidad cilíndrica de aproximadamente 3mm de profundidad y xxx de diámetro, donde el polvo se compactó con un vidrio plano, procurando que el polvo quede perfectamente comprimido lo más uniformemente posible. A continuación se coloca en el difractómetro de polvos de rayos X para la identificación de las fases que se constituyen a la muestra en estudio.

Figura 2.5 Difractómetro de Rayos X (DRX).

2.4.3 Microscopia electrónica de transmisión

Para la caracterización nanoestructural del material, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión de la marca JEOL, modelo JEM-1010 **(fig. 2.6)**, equipado con una cámara Gatan Bioscan de 1Kx1K que utiliza el programa Digital Micrograph 3.1 para adquisición de imágenes. El microscopio utiliza un fino haz de electrones acelerados a gran velocidad a 70 KV como fuente de iluminación para poder ver las imágenes.

Los resultados que se obtuvieron a partir de la microscopia electrónica de barrido no fueron suficientes para apreciar con mayor detalle la morfología de las partículas, por lo cual se realizó la caracterización por microscopia electrónica de transmisión para observar mejor la forma de las partículas.

Para la preparación de las muestras obtenidas a partir de la síntesis del sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4, los polvos obtenidos fueron molidos en un mortero de ágata, hasta obtener partículas finas de la cual se tomó una pequeña cantidad y se colocaron en viales y fueron enviados para el análisis.

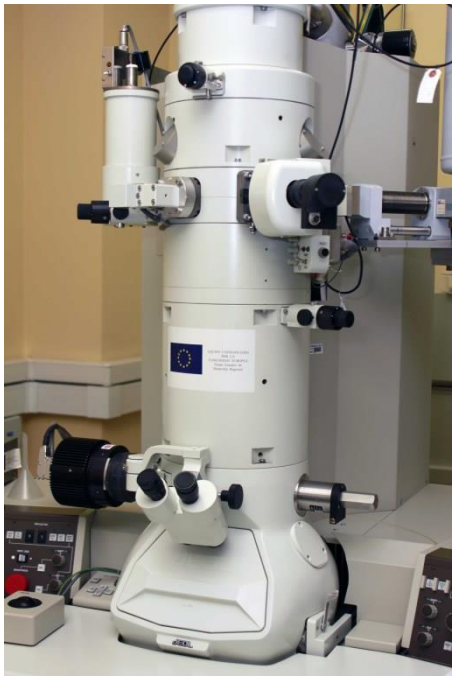


Figura 2.6 Microscopio electrónico de transmisión (TEM).

2.5 Estudio antimicrobiano

El estudio se realizó para determinar la efectividad antimicrobiana de las muestras obtenidas a partir de la síntesis por el método de precipitación, se probó utilizando dos bacterias y un hongo.

A continuación se presentan las características de los siguientes modelos biológicos para el estudio antimicrobiano.

- Bacterias: (Medio de cultivo Mueller hinton)
  - ✓ *E. coli:* Bacilo gram-negativo el cual no forma esporas, tienen forma de barra, es un anaeróbico facultativo y pertenecen a la familia enterobacteria.

    Esta especie bacteriana es uno de los habitantes más comunes del extracto humano y el microorganismo más familiar en la microbiología.

    En la actualidad dicha bacteria continúa siendo una herramienta importante para la investigación biológica, por su presencia en el agua y en los alimentos, a consecuencia de la contaminación fecal.
  - ✓ *B. thuringiensis*: Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganotrofo y con actividad de catalasa.

    Es un bacilo gram-positivo, posee las características de desarrollar espora de resistencia. El *Bacillus thuringiensis* es considerado el patógeno más exitoso y posee un gran potencial para desarrollarse como la bacteria con cualidades insecticidas.
- Hongo: (Medio de cultivo Papa dextrosa)
  - ✓ *Aspergillus niger:* Es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo ascomycota. *Aspergillus* es uno de los principales hongos productores de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos.

El método por el cual se realizó esta prueba fue por el procedimiento de Kirby-Bauer, dicho estudio fue seleccionado por las siguientes ventajas: es un método sencillo, barato y fácil control e estandarización.

Una ventaja adicional de este método y específicamente del medio, es que se le pueden realizar algunas modificaciones en cuanto a los requerimientos nutricionales. La prueba es recomendada por la NCCLS (National committe for clinical laboratory standards) que cambió su nombre en 2005 a CLSI (Clinical and laboratory standards institue).

El siguiente paso, después de la selección de los microorganismos para dicha prueba fue la previa elaboración de medios de cultivos para las bacterias y el hongo.

2.5.1. Medio de cultivo Muller hinton

Este medio de cultivo se preparó utilizando el agar en polvo de Muller hinton de la siguiente forma:

1. Se pesaron 38 gramos del medio y se mezcló en un medio litro de agua destilada.
2. Se calentó agitando frecuentemente hasta que el polvo quedara totalmente diluido y se dejó hirviendo mientras se continuaba agitando durante 1 minuto.
3. Se colocó en el interior de una autoclave y se dejó esterilizar durante 15 a 18 minutos a una presión de 18lb/pulg^2.
4. Se retiró de la autoclave y se dejó enfriar a 45 ó 50°C.
5. Se vertió el medio en cajas Petri en una campana de flujo laminar previamente desinfectada.
6. Por último después de enfriarse a temperatura ambiente, se guardaron las cajas Petri con el medio de cultivo en refrigerador a 4°C.

2.5.2. Medio de cultivo Papa dextrosa

Este medio de cultivo se preparó utilizando el agar en polvo de papa dextrosa de la siguiente manera:

1. Se pesaron 19.5 gramos del medio y se mezcló en un medio litro de agua destilada.
2. Se calentó agitando frecuentemente hasta que el polvo del medio quedará totalmente diluida y se dejó hirviendo mientras se continuaba agitando durante el tiempo de 1 minuto.
3. Posteriormente se colocó en el interior de una autoclave donde se dejó esterilizar durante 15 a 18 minutos a una presión de 18 lb/pulg^2.
4. Se retiró de la autoclave y enfrió a 45 ó 50°C.
5. Se vertió el medio en cajas Petri en una campana de flujo laminar previamente desinfectada.
6. Por último después de enfriarse a temperatura ambiente, se guardaron las cajas Petri con el medio de cultivo en refrigerador a 4°C.

2.5.3 Estudio antimicrobiano para*: E. coli, B. thuringiensis* y *A. niger*

Para la identificación de los microorganismos, se llevó a cabo el aislamiento del resto de los microbios presentes (las muestras microbiológicas fueron proporcionadas en el laboratorio donde se realizó el estudio).

El aislamiento es la separación de un determinado microorganismo del resto que le acompañan. El método que se utilizó es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una caja Petri **(fig. 2.7 ejemplo del Método de siembra por estría)**.

Este procedimiento se llevó a cabo, tomando una pequeña cantidad de muestra con un asa bacteriológica con la cual se repartió sobre la superficie del medio de cultivo. Sobre el medio quedaron separados e inmóviles los microorganismos.

Tras la incubación en condiciones adecuadas:

- *E. coli*: A temperatura de 37°C en incubadora durante aproximadamente entre 21-22hrs.

- *B. thuringiensis*: A temperatura de 37°C en incubadora durante aproximadamente entre 21-22hrs.

- *A. niger*: A temperatura de 37°C en incubadora durante aproximadamente de 21-22hrs.

La temperatura de incubación para las bacterias *E. coli* y *B. thuringiensis* fue utilizada ya que a dicha temperatura estos microorganismos se desarrollan, y de igual manera a temperatura ambiente para el hongo *A. niger*.

Tras la incubación, cada microorganismo origina una colonia visible resultado de sucesivas divisiones. Cada colonia tiene sus características determinadas. A partir de las colonias separadas suficientemente fue posible obtener un cultivo de cada uno de estos tipos de microbios presentes en la muestra original.

Este método fue importante realizar el mayor número de estrías posibles, en las primeras estrías se observó que aparecían colonias aglomeradas o una masa continua de microorganismos y en las estrías finales aparecieron colonias separadas unas de otras. El aislamiento requirió de un reducido inóculo de partida.

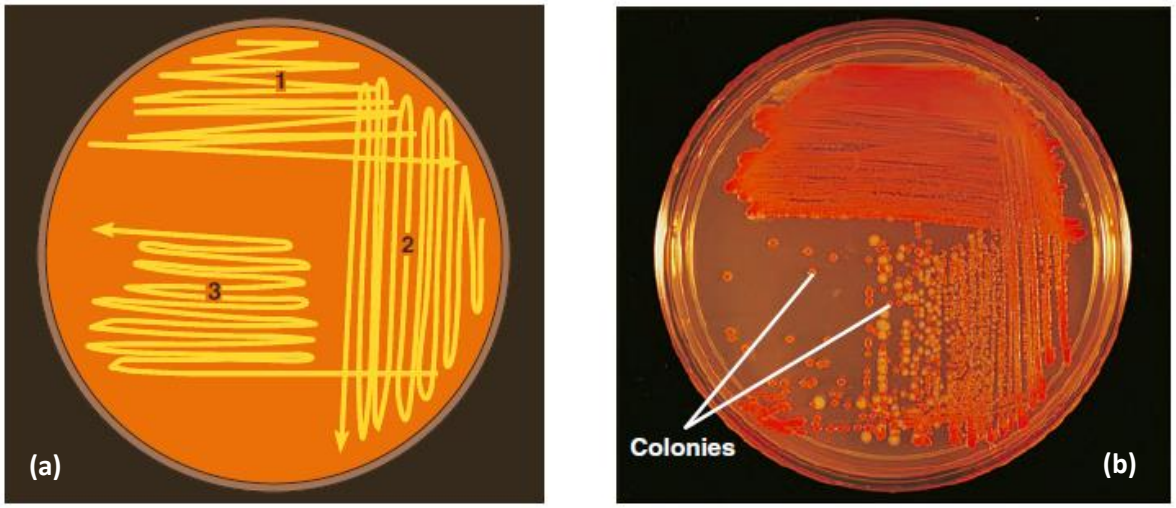


Figura 2.7 Método de siembra por estría en placa para el aislamiento de cultivos bacterianos puros. (a) La dirección del estriado está indicada por las flechas. La estría de la serie 1 se forma a partir del cultivo bacteriano original. El ansa de inoculación se esteriliza después de cada serie de estrías. Rn las series 2 y 3 el asa forma bacterias de la serie anterior, con lo que se diluye el número de células cada vez. Hay numerosas variantes de estos patrones. (b) En la serie 3 de este ejemplo se obtuvieron colonias bien aisladas de dos tipos diferentes de bacterias, rojas y amarillas. Imagen tomada de Gerard J. Tortora, 2007.

Previamente todo el material que se usó fue esterilizado en la autoclave a una presión de 20lb/pulg^2 durante un tiempo aproximado de 20 minutos.

A continuación se evaluaron las muestras que fueron obtenidas, a partir de los cultivos que fueron aislados se tomó una pequeña cantidad de la muestra de los microorganismos con ayuda de una asa bacteriológica y se inoculo en la superficie del medio de cultivo en cada una de las cajas Petri, con ayuda de perlas de ebullición se procuró distribuirlas por el total de la superficie de medio de cultivo para realizar cuidadosamente un tapete homogéneo.

Al terminar, las perlas de ebullición fueron retiradas con precaución y colocadas en un vaso de precipitados que contenía alcohol al 70% (Alcohol al 70% elimina los microorganismos).

Para comenzar con el procedimiento de Kirby-Bauer, se tomaron discos de papel filtro (esterilizados previamente) con un diámetro de 6mm (el diámetro de los discos no es estandarizado, se seleccionó dicha medida por practicidad y conveniencia del estudio), los discos fueron colocados en la superficie del medio de cultivo con ayuda de unas pinzas.

Se colocaron 3 discos por cada una de las cajas Petri, continuamente se adiciono con ayuda de una micropipeta una cantidad de 8 microlitros de solución de cada una de las muestras obtenidas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 a una concentración de 0.07M, hidroxiapatita de 0.09M y Ag_3PO4 a 0.23M para el caso de las bacterias y para los hongos se manejó una concentración de 0.14M para hidroxiapatita-Ag_3PO_4, 0.19M de hidroxiapatita y 0.47M de Ag_3PO_4

Las muestras previamente se disolvieron los 100mg en 1 mililitro de agua desionizada e esterilizada para el caso de las bacterias y en del hongo se disolvió 200mg en 1 mililitro de agua igualmente desionizada e esterilizada.

Por último, ya colocado los discos con la solución de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 ya cerrados y etiquetados, se introdujeron a una incubadora a una temperatura de 37°C durante un tiempo aproximadamente entre 21-22hrs. Los parámetros como el tiempo y la

temperatura de la incubadora (marca Barnstead/Lab-line) permiten que el crecimiento del microorganismo y la difusión del químico se desarrollen mejor y no irregularmente, ya que a menor tiempo y menor temperatura disminuyen la velocidad de crecimiento del microorganismo y la difusión del químico.

A continuación se muestra un breve diagrama del procedimiento que se llevó a cabo **(fig. 2.8)**.

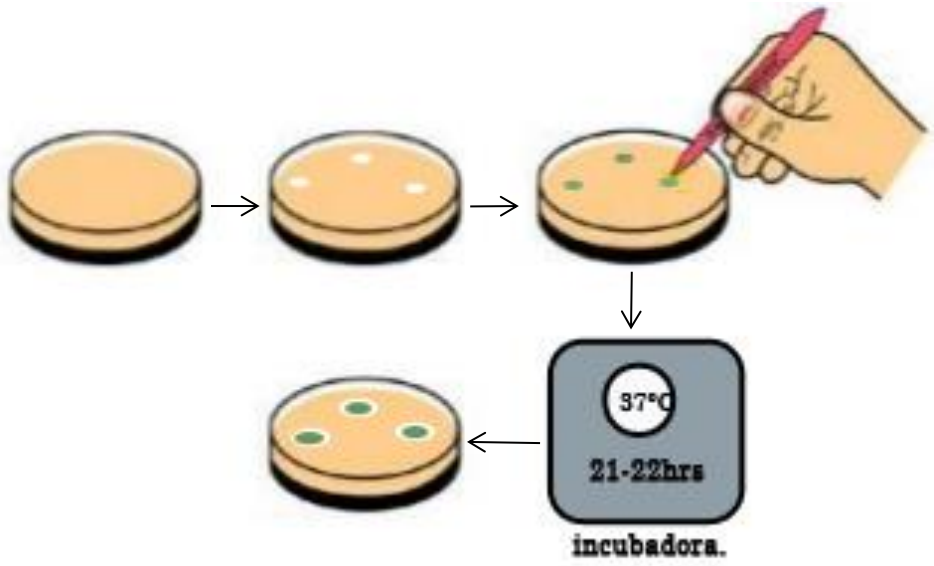


Figura 2.8 Diagrama del proceso que se realizo para el estudio antimicrobiano de las muestras.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

En el presente capítulo se muestran los resultados y la caracterización por Difracción de Rayos X (DRX), Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), Microscopia Electrónica de Transmisión (MET), Espectroscopia de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) y los resultados obtenidos por medio del estudio antimicrobiano usando el método de Kirby-Bauer.

3.1 Muestras obtenidas a partir de la síntesis.

A continuación se describen cada una de las fotografías, en las que podemos observar a detalle la coloración y el aspecto de cada una.

En la **figura 3.1 (a)** se muestra la imagen de la hidroxiapatita pura $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ donde podemos observar una coloración blanca y su aspecto finamente granular. La muestra posee 100% en peso de hidroxiapatita. La **figura 3.1 (b)** es la imagen del Ag_3PO_4 puro, en el cual se aprecian partículas sumamente compactadas con una coloración amarilla, la cual es característica del fosfato de plata.

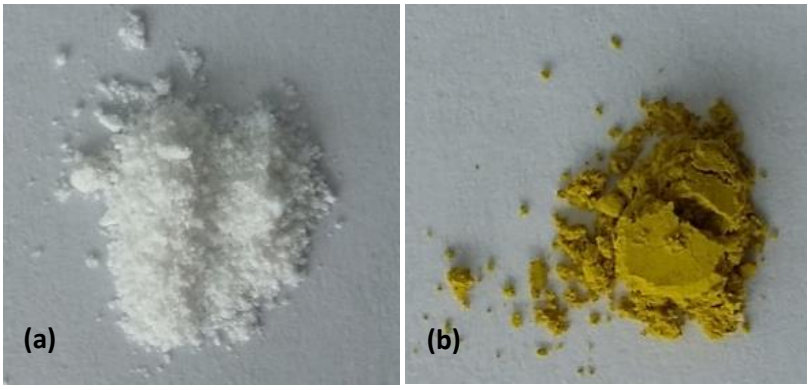


Figura 3.1 Fotografías de las muestras: (a) Hidroxiapatita pura y (b) Fosfato de plata puro.

En la **figura 3.2** se presentan las imágenes tomadas de las muestras de la M1-M6, donde se presenta el porcentaje en peso de Ag_3PO_4 y hidroxiapatita. En cada foto se observan

diferentes tipos de coloraciones, desde una tonalidad verde, café y un color grisáceo. El aspecto de las muestras M1 y M4, de las imágenes (a) y (d) poseen la misma tonalidad verde oscuro grisáceo, mientras que M3 (c) y M6 (f) tienen un color verde más claro y en el caso de M2 (b) y M5 (e) se observa la misma tonalidad aunque en M5 es más con tendencia a café y en M2 es verde. Referente a su aspecto granular es totalmente fino.

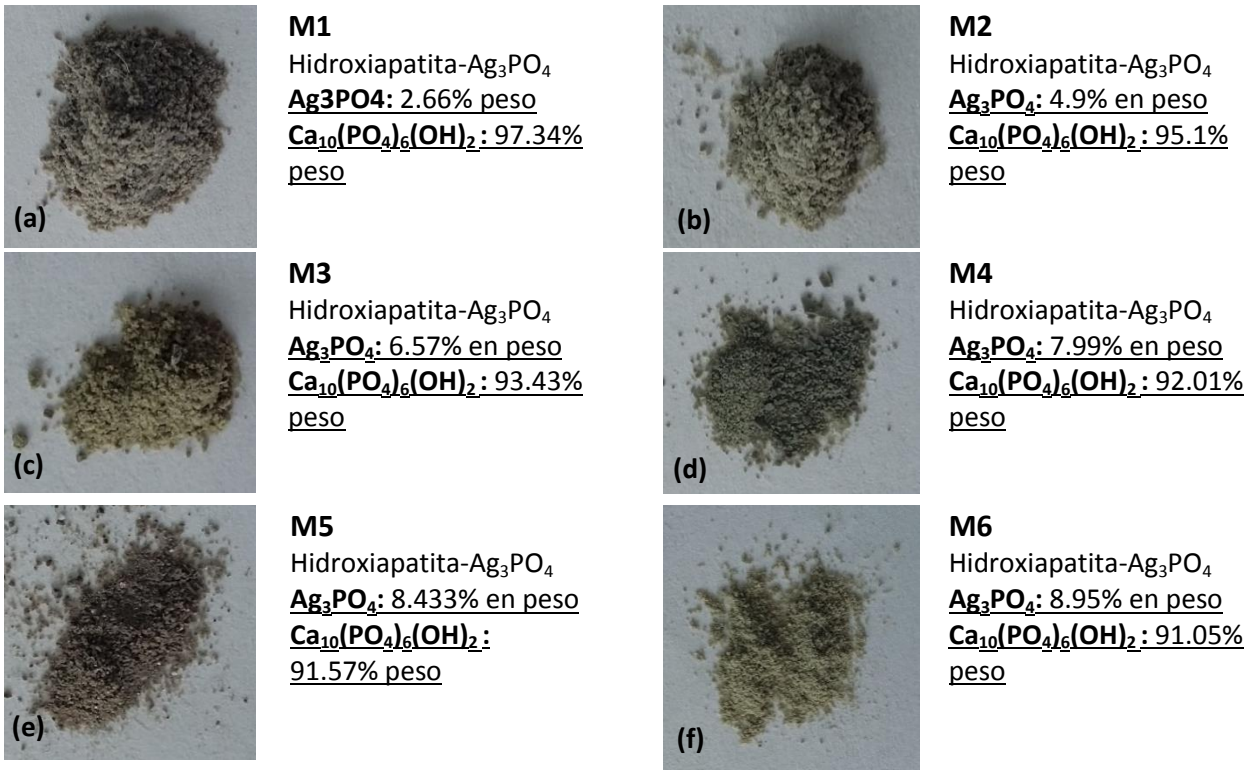


Figura 3.2 Fotografías de las muestras obtenidas de la síntesis del sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4 indicando en cada una el porcentaje en peso de Ag_3PO_4 y de hidroxiapatita.

3.2 Caracterización por Difracción de rayos X.

En la **figura 3.3** observamos los difractogramas correspondientes a las muestras de la hidroxiapatita, el fosfato de plata y de M1-M6 son las muestras obtenidas a partir de la síntesis, en donde se confirma la presencia de las fases cristalinas de la hidroxiapatita y de el fosfato de plata.

Los difractogramas de difracción de rayos X muestran los patrones de hidroxiapatita pura, Ag_3PO_4 puro y de las muestras M1-M6. El patrón de difracción de la hidroxiapatita

muestra picos a 25.9°, 31.8°, 32.17°, 32.9° y 34.1° los cuales corresponde a los planos [002], [211], [112], [300] y [202] respectivamente, mientras que el patrón de difracción que presenta picos bien definidos a 33.3°, 29.7° y 36.6° que pertenecen a los planos [210], [200] y [211] los cuales coinciden con los planos cristalinos de una forma cúbica centrada en el cuerpo del Ag_3PO_4.

En el caso de las muestras M1-M6 se definen picos a 25.9°, 29.7°, 31.8°, 32.17°, 32.9°, 33.3°, 34.1° y 36.6° que corresponden a los planos cristalinos de la hidroxiapatita y del Ag_3PO_4 respectivamente, los cuales se van definiendo mejor dependiendo de la concentración de Ag_3PO_4 que hay en cada, así como el porcentaje de concentración que presenta de hiroxiapatita.

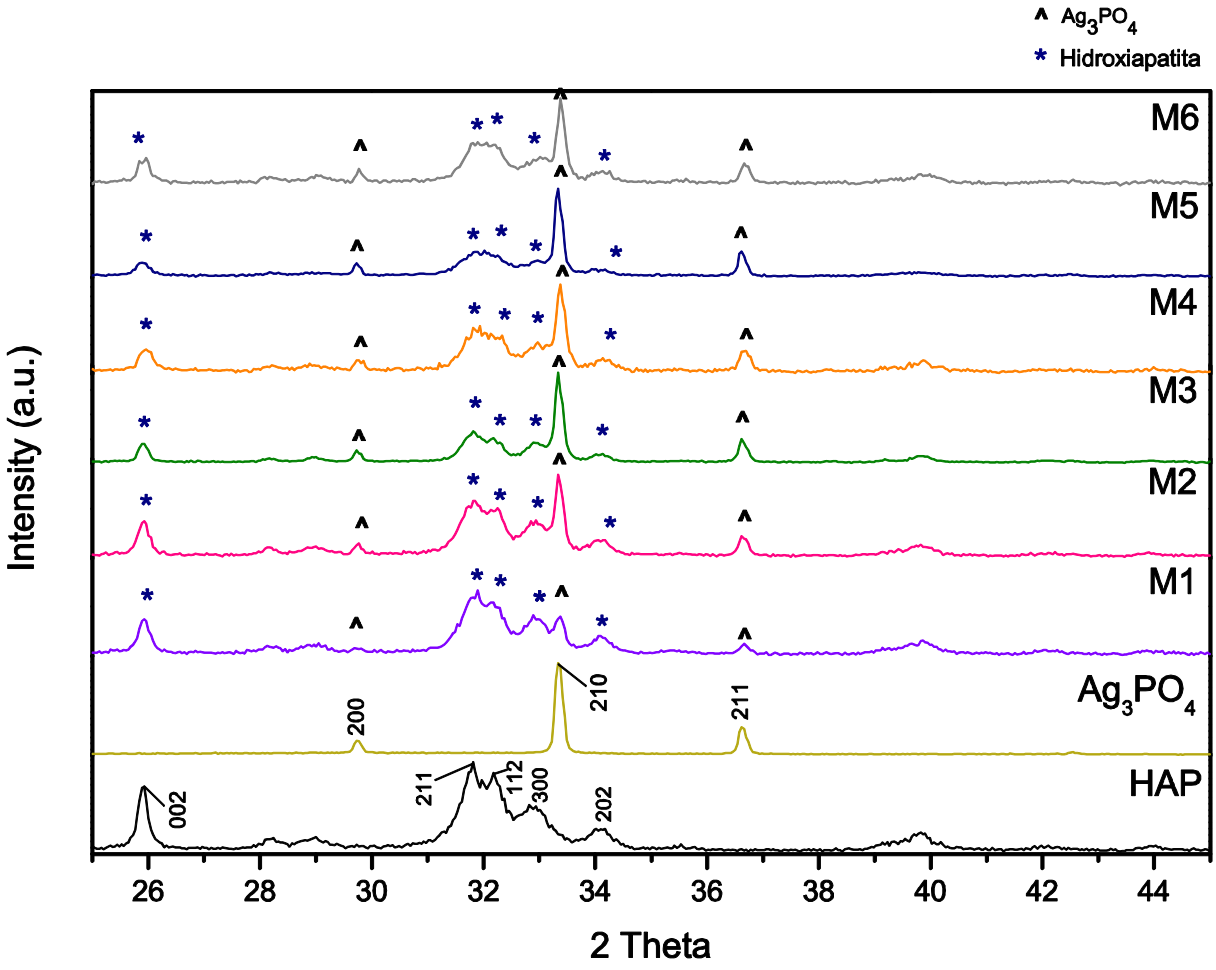


Figura 3.3 Patrones de Difracción de rayos X de hidroxiapatita, Ag_3PO_4, así como de M1-M6.

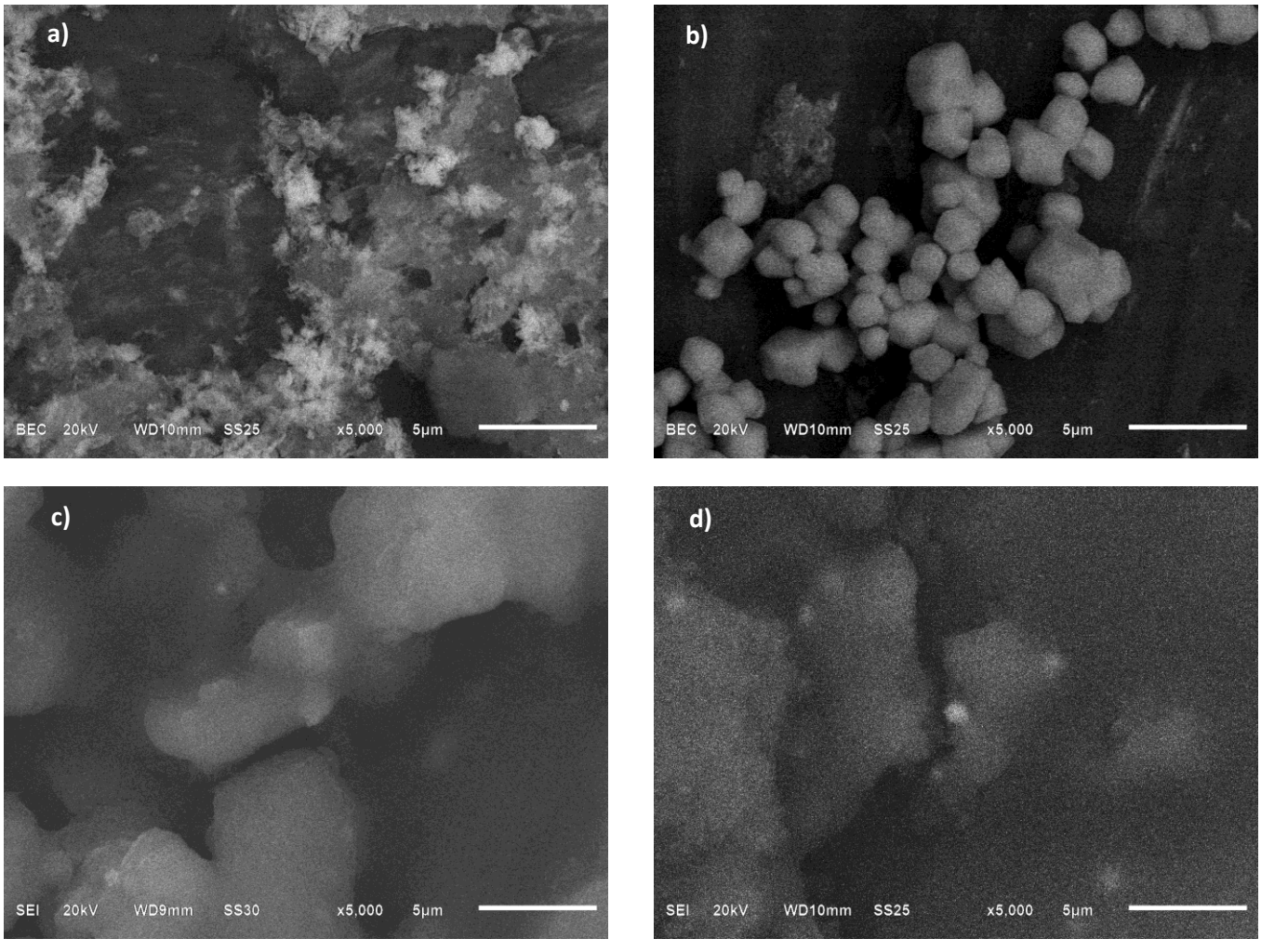
.

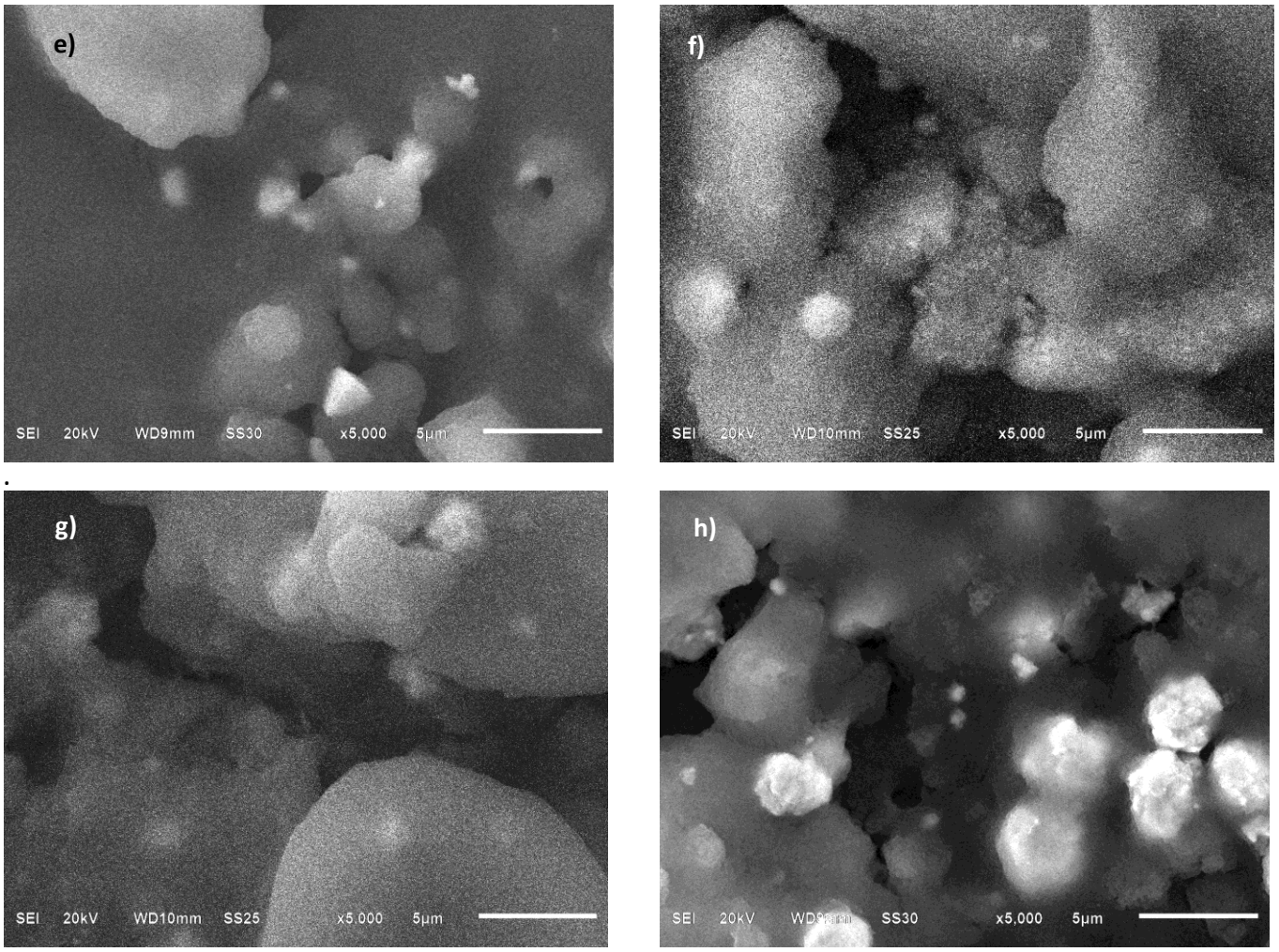
3.3 Caracterización por Microscopía electrónica de barrido.

La caracterización microestructural por microscopia electrónica de barrido, se empleó para evaluar las características morfológicas de la hidroxiapatita, Ag_3PO_4 y de las muestras M1-M6 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4).

La **figura 3.3** se presenta las micrografías de las muestras preparadas y obtenidas por el método de precipitación.

La magnificación es la misma en todas las muestras y se llevó a cabo a 5000x aumentos. Con esta magnificación obtenemos una vista general de la microestructura de las muestras.





.

Figura 3.3 Micrografías de las muestras obtenidas a partir de la síntesis, 8a) Hidroxiapatita, (b) Ag_3PO_4 y de (c) a (h) corresponden a las muestras de M1 a M6 (Hidroxiapatita-Ag_3PO_4) todas a una ampliación de 5,000.

Al comparar las micrografías de M1 (c) a M6 (h), podemos observar una gran cantidad de aglomerados, donde se aprecia un tamaño de dicho conglomerado de aproximadamente 5 a 10 µm.

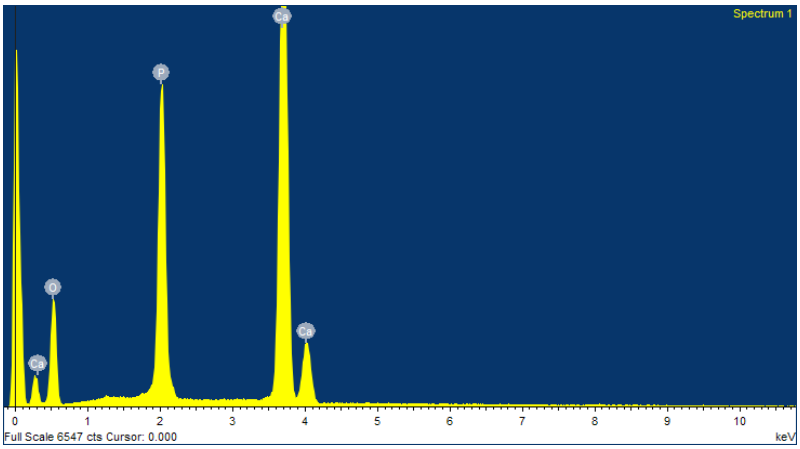
En el caso de las micrografías correspondientes al Ag_3PO_4 (b) y de la hidroxiapatita (a) se muestran diferentes aspectos, en la hidroxiapatita no se observa ninguna estructura definida.

El Ag_3PO_4 se examina que la estructura tiene un aspecto bien definido de la forma cubica, que a pesar de presentarse aglomerados, se puede apreciar dicha estructura, el tamaño de dichos conjuntos que se observa en la micrografía es de aproximadamente 2 a 5 µm.

3.4 Caracterización por Análisis químico elemental (EDS).

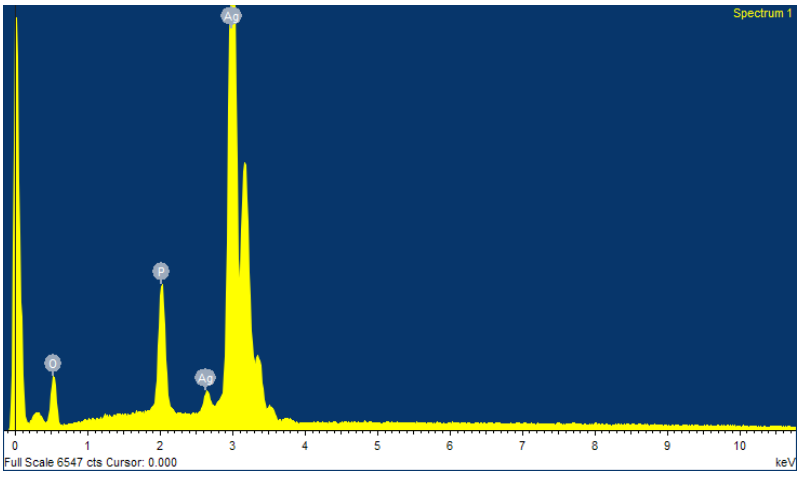
El análisis químico elemental (EDS- engergy dispersive spectrometer) evalúa la composición de las muestras que se pueden apreciar en la **fig. 3.4** Donde se observa los histogramas, espectrogramas de EDS, y datos de (a) y (b) muestra la composición de la hidroxiapatita (a) y Ag_3PO_4 (b), mientras que de (c) a (h) pertenecen a M1-M6, donde la proporción elemental de M1 que posee un menor porcentaje en peso de plata, en la que se observa el incremento hasta M6 que es la que tiene una mayor cantidad de dicho elemento.

a)



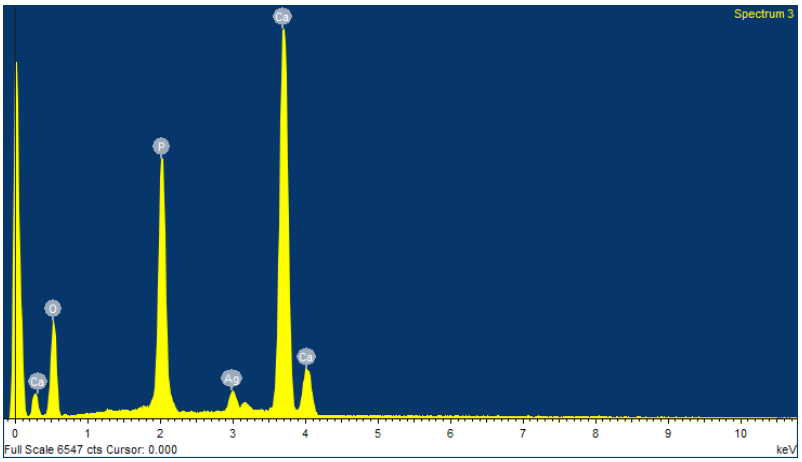
Elemento	Peso%
O	47.56
P	15.93
Ca	40.57
Total	100

b)



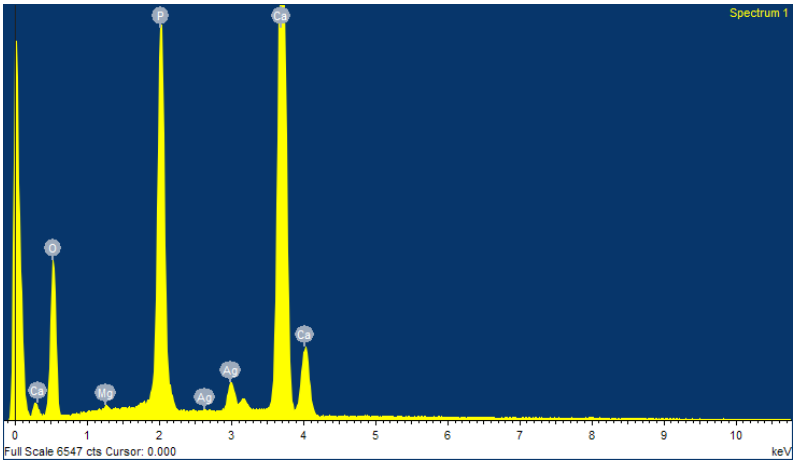
Elemento	Peso%
O	22.02
P	6.29
Ag	71.68
Total	100

c)



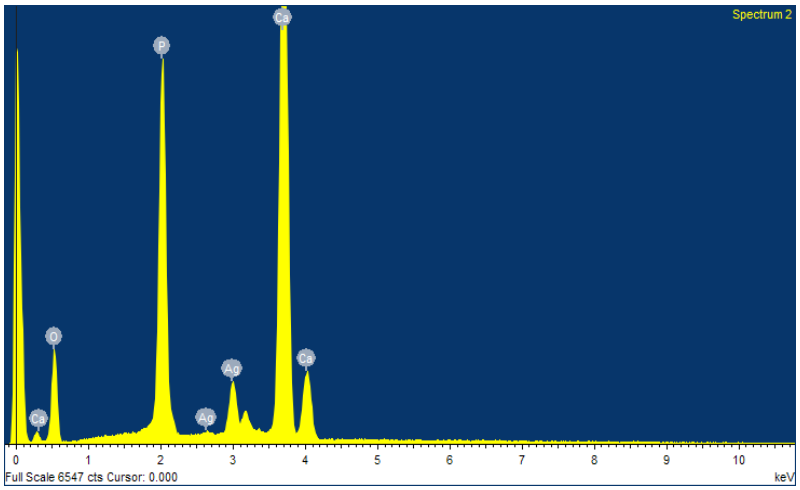
Elemento	Peso%
O	45.4
P	16.29
Ca	36.24
Ag	2.06
Total	100

d)



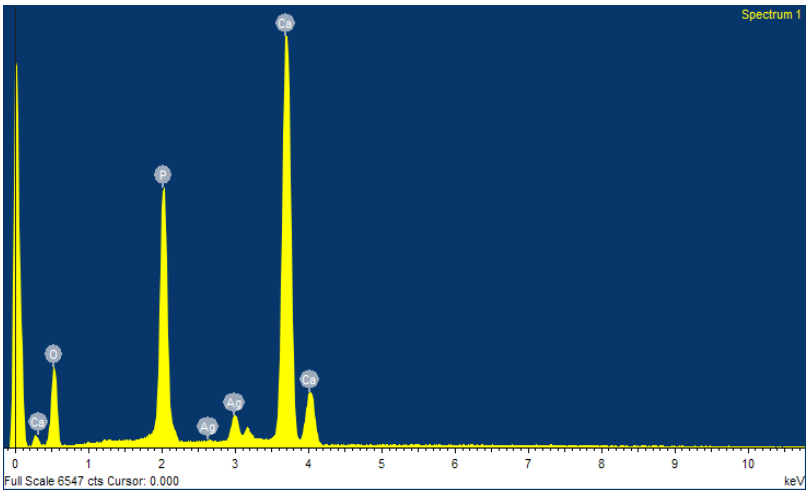
Elemento	Peso%
O	46.85
P	15.69
Ca	33.65
Ag	3.79
Total	100

e)



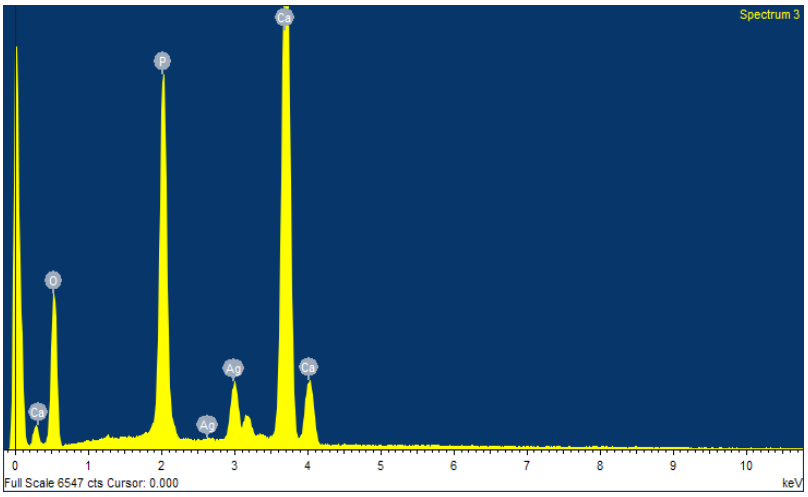
Elemento	Peso%
O	46.04
P	15.44
Ca	33.41
Ag	5.09
Total	100

f)



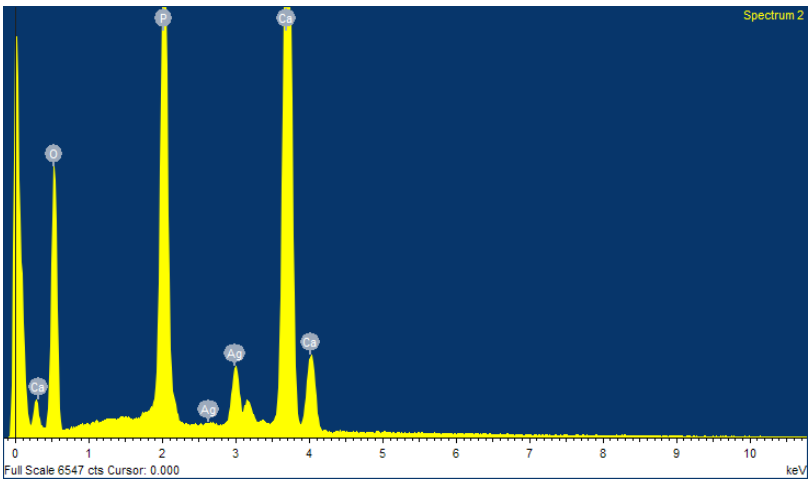
Elemento	Peso%
O	52.04
P	14.56
Ca	28.27
Ag	5.12
Total	100

g)



Elemento	Peso%
O	47.9
P	14.74
Ca	30.84
Ag	6.52
Total	100

h)



Elemento	Peso%
O	43.87
P	15.7
Ca	33.5
Ag	6.92
Total	100

Figura 3.4 Espectros y tablas de (EDS) (a) hidroxiapatita, (b) Ag_3PO_4, (c) M1 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4), (d) M2 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4), (e) M3 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4) (f) M4 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4), (g) M5 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4) y (h) M6 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4).

3.5 Caracterización por Microscopía electrónica de transmisión.

La caracterización microestructural por microscopía electrónica de transmisión se empleó al igual que SEM, para evaluar las características morfológicas de la hidroxiapatita, el Ag_3PO_4 y las muestras M1 y M2 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4).

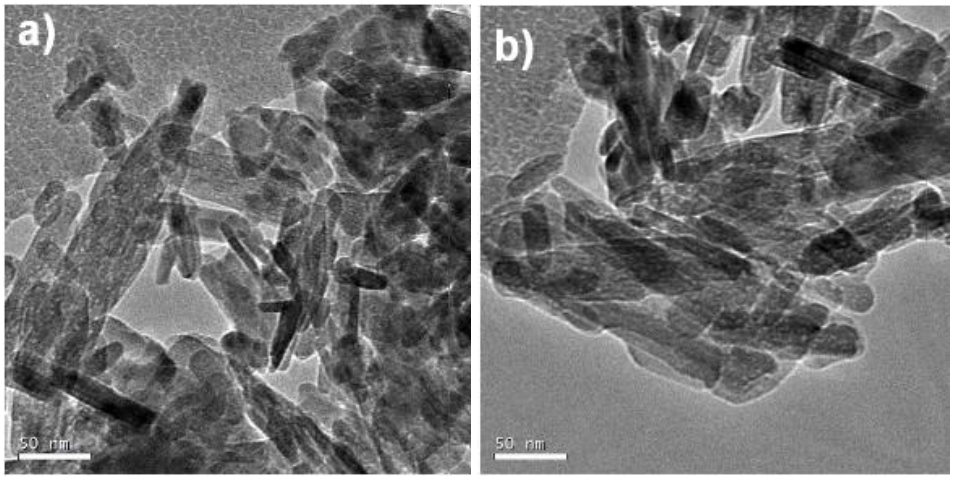
En la **fig. 3.5** se presentan las micrografías, preparadas y obtenidas a partir del método de precipitación.

En las imágenes (a) y (b) que son pertenecientes a la hidroxiapatita que fue sintetizada en el laboratorio, se puede apreciar perfectamente bien la morfología de "barras", dichas partículas se observaron que están aglomeradas y se aprecian en las siguientes ampliaciones de 200 nm, 100 nm y 50 nm

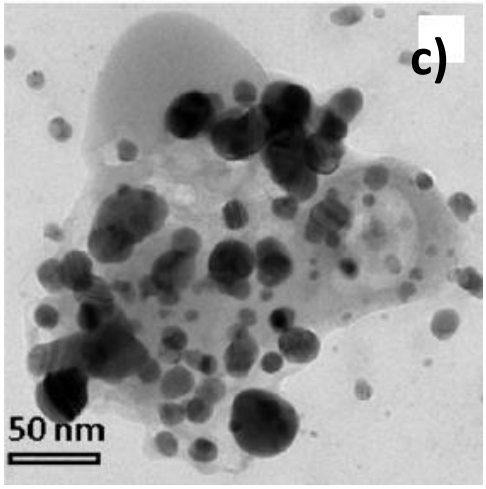
La micrografía de una amplificación de 50 nm (c) fue tomada del trabajo de Xiaoting Hong y colaboradores del 2012. Se puede apreciar formas circulares, unas más intensamente oscuras que otras.

Las imágenes (d), (e) y (f) se observan las micrografías de la muestra M2 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4) a ampliaciones de 200 nm, 100 nm y 50 nm, en las cuales se puede apreciar las nanopartículas de hidroxiapatita (rods) y las nanoparticulas de Ag_3PO_4 que poseen formas esféricas y de las cuales hay una mayor proporción.

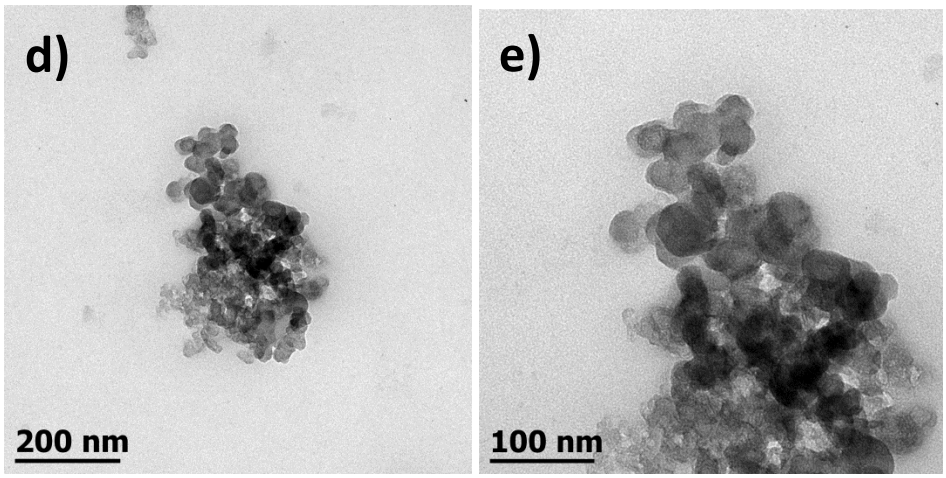
Las micrografías (g), (h) e (i) correspondientes a la muestra M1 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4) a ampliaciones de 200nm, 100nm y 50nm, de las cuales se puede apreciar tanto nanopartículas de hidroxiapatita (rods) y de Ag_3PO_4 (circulares). En dicha muestra se puede observar una mayor proporción de partículas de hidroxiapatita que de Ag_3PO_4.

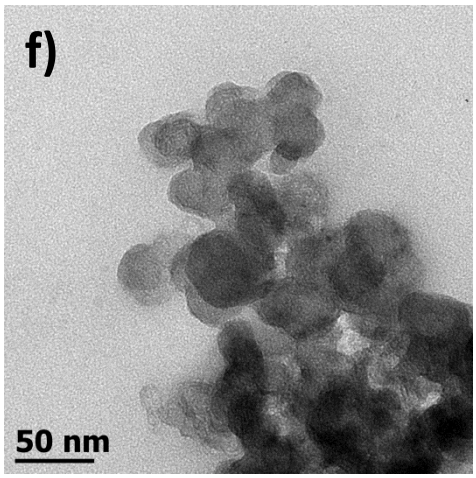


Micrografías de la muestra de Hidroxiapatita a una ampliación de 50nm.

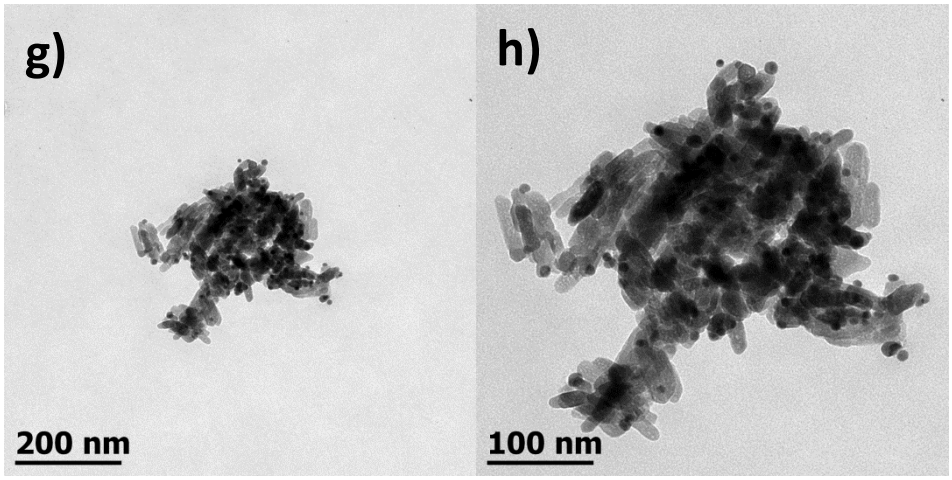


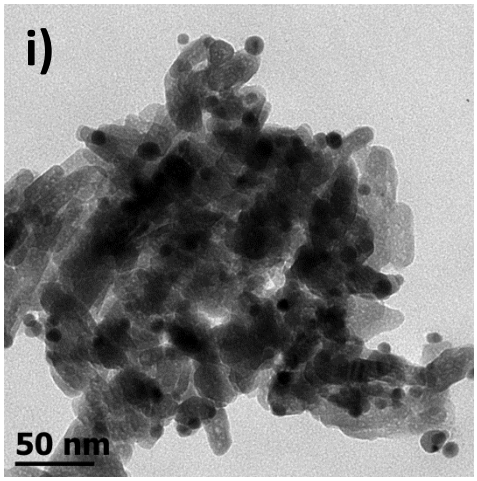
Micrografías de la muestra de Ag_3PO_4 a una ampliación de 50nm. Imagen tomada del artículo de Xiaoting Hong, 2012.





Micrografías de la muestra M2 de Hidroxiapatita-Ag_3PO_4 a una ampliación de 200nm, 100nm y 50nm.





Micrografías de la muestra M1 de Hidroxiapatita-Ag_3PO_4 a una ampliación de 200nm, 100nm y 50nm.

Figura 3.5 Micrografías de las muestras obtenidas a partir de la síntesis, a una ampliación de 200nm, 100nm y 50nm.

3.6 Estudio antimicrobiano del sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4

Para este análisis se realizó un procedimiento que se menciona en la sección 2.5.3 del capítulo 2, donde se describe el estudio de Kirby-Bauer adaptado por la NCCLS (National committe for clinical laboratory standards), para la prueba en la cual se determinó la propiedad antimicrobiana de las bacterias*: E. coli* y *B. thuringiensis*, y el hongo: *A. niger*.

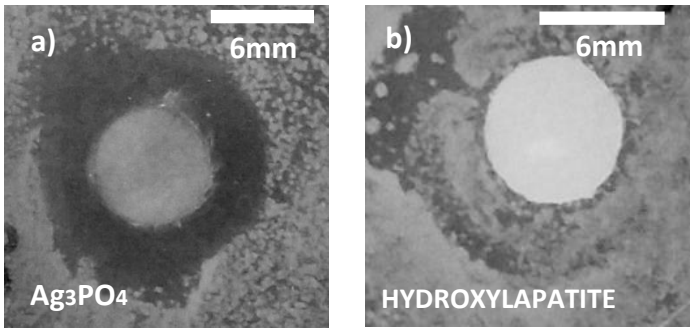
3.6.1 Bacteria *Escherichia coli*.

A continuación en la **fig. 3.6**, se muestran fotos características tomadas para el crecimiento de la bacteria *E. coli* después de aproximadamente entre 21 a 22 horas de contacto con los discos modificados (6 mm de diámetro) con nanopartículas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 de los cuales cada una de las muestras, imágenes de (c) M1 a (h) M6 poseen de menor a mayor porcentaje en peso de Ag_3PO_4.

Las fotografías (a) y (b) de la fig. 3.6, son pertenecientes al Ag_3PO_4 y la hidroxiapatita respectivamente.

A partir de estas imágenes se observó que los halos de inhibición, después de entre 21 a 22 horas de contacto, se presenta un diámetro promedio de 9 milímetros de diámetro para M1(c) a M6 (h). En comparación con la imagen (a) que corresponde al Ag_3PO_4 (blanco positivo) que muestra un halo de inhibición de 10 milímetros de diámetro.

La fotografía (b) que pertenece a la hidroxiapatita (blanco negativo) no presentó después del tiempo anteriormente mencionado, ningún halo de inhibición.



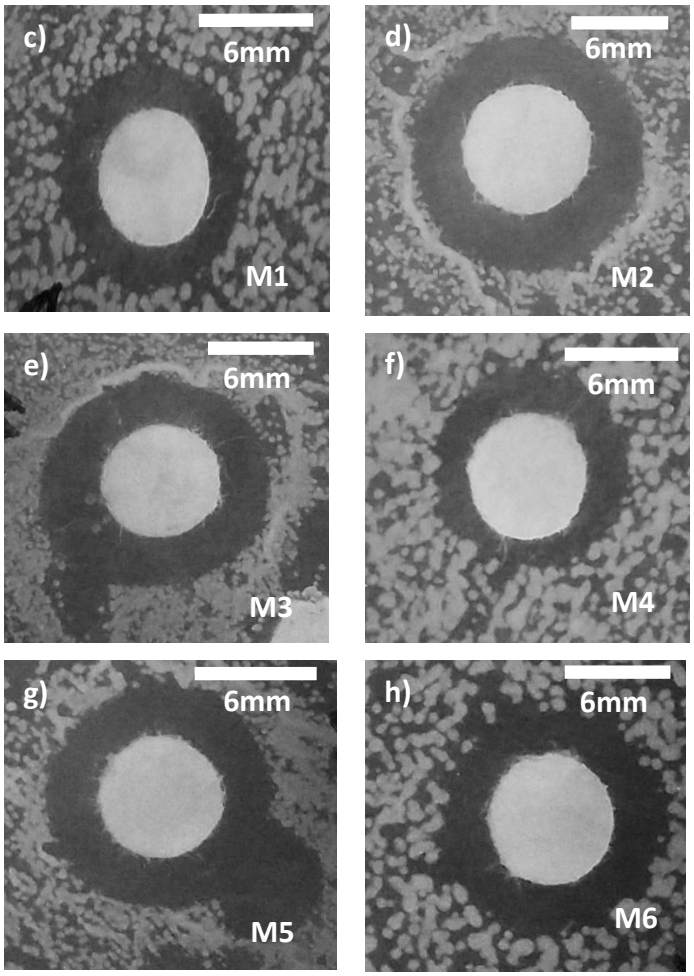


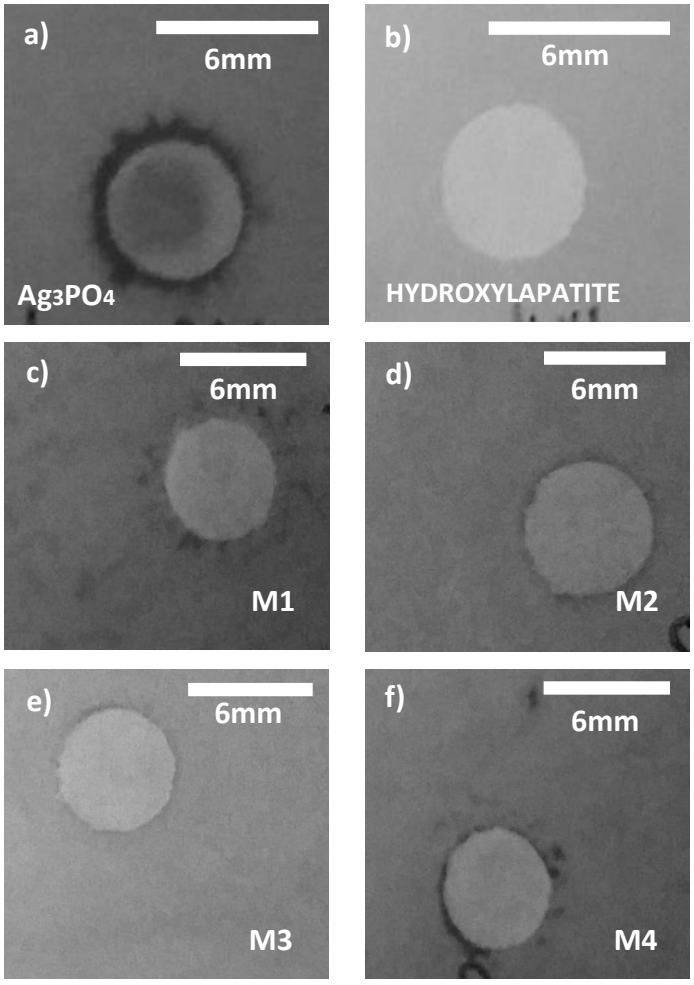
Figura 3.6. Método del halo de inhibición para *Escherichia coli*. a) Ensayo control negativo: no se observó halo de inhibición en el caso de un disco de papel de filtro embebido con agua desionizada estéril y HA. B) Ensayo control positivo: Se observó halo de inhibición en el caso de un disco de papel filtro embebido con Ag_3PO_4. c)- h) Imagen del halo de inhibición formado alrededor de un disco de papel de filtro embebido con NPs (nanopartículas) de HA-Ag_3PO_4.

3.6.2 Bacteria *Bacillus thuringiensis*

Se presenta en la **fig. 3.7**, imágenes características tomadas para el crecimiento de la bacteria *B. thuringiensis*, después de 21 a 22 horas de contacto con los discos modificados (6mm de diámetro) con nanopartículas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 de las cuales cada una son las fotografías de (c) M1 a (h) M6 que poseen de menor a mayor porcentaje en peso de Ag_3PO_4, mientras que las imágenes (a) y (b) corresponden a el Ag_3PO_4 y la hidroxiapatita respectivamente.

A partir de estas fotografías, el Ag_3PO_4 (a) es el blanco positivo que presenta un ligero halo de inhibición de 1 milímetro, mientras que la hidroxiapatita el blanco negativo no presenta dicha propiedad.

En el caso de las imágenes de (c) a (h) se aprecia una resistencia de la bacteria, a su vez se logra observar que a un mayor porcentaje de Ag_3PO_4 de cada una de las muestras M1-M6 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4) se percibe ligeramente un halo de inhibición, el cual no fue posible medir por el diámetro mínimo que posee.



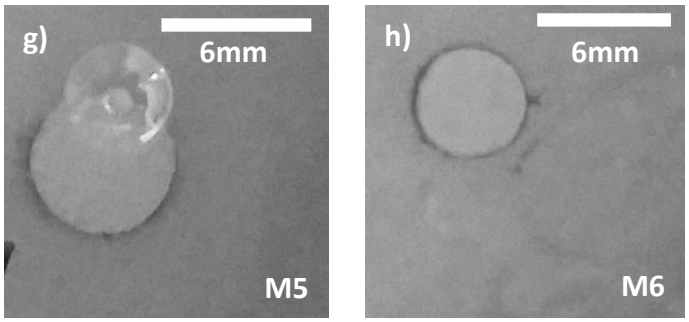


Figura 3.7. Método del halo de inhibición para *Bacillus thuringiensis*. a) Ensayo control negativo: no se observó halo de inhibición en el caso de un disco de papel de filtro embebido con agua desionizada estéril y HA. B) Ensayo control positivo: Se observó halo de inhibición en el caso de un disco de papel filtro embebido con Ag_3PO_4. c)- h) Imagen del halo de inhibición formado alrededor de un disco de papel de filtro embebido con NPs (nanopartículas) de HA-Ag_3PO_4.

3.6.3 Hongo *Aspergillus niger*.

La **fig. 3.8** presenta las fotografías tomadas para el crecimiento del hongo *A. niger*, después de 21 a 22 horas de contacto con los discos modificados (6mm de diámetro) con nanopartículas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 de las cuales las imágenes siguientes pertenecientes son (c) M1 a (h) M6 que poseen de menor a mayor porcentaje de Ag_3PO_4, mientras que las imágenes (a) y (b) pertenecen a el Ag_3PO_4 y a la hidroxiapatita.

En las fotografías, el Ag_3PO_4 (a) fue el blanco negativo, presentando un halo de inhibición de 8 milímetros de diámetro, mientras que la hidroxiapatita (b) que fue el blanco negativo no presentó dicha propiedad antimicrobiana.

Las imágenes de (c) a (e) casi no presentan resistencia al hongo a comparación de las fotografías de (f) a (h) donde se aprecia de mejor manera el halo de inhibición que en el caso de las imágenes de dichas muestras presento: (f) M4 7 milímetros de diámetro, (g) M5 7.5 milímetros y (h) M6 8 milímetros de diámetro.

Así es como a una mayor presencia del Ag_3PO_4 en la solución de hidroxiapatita-Ag_3PO_4, hay una mayor efectividad antimicrobiana.

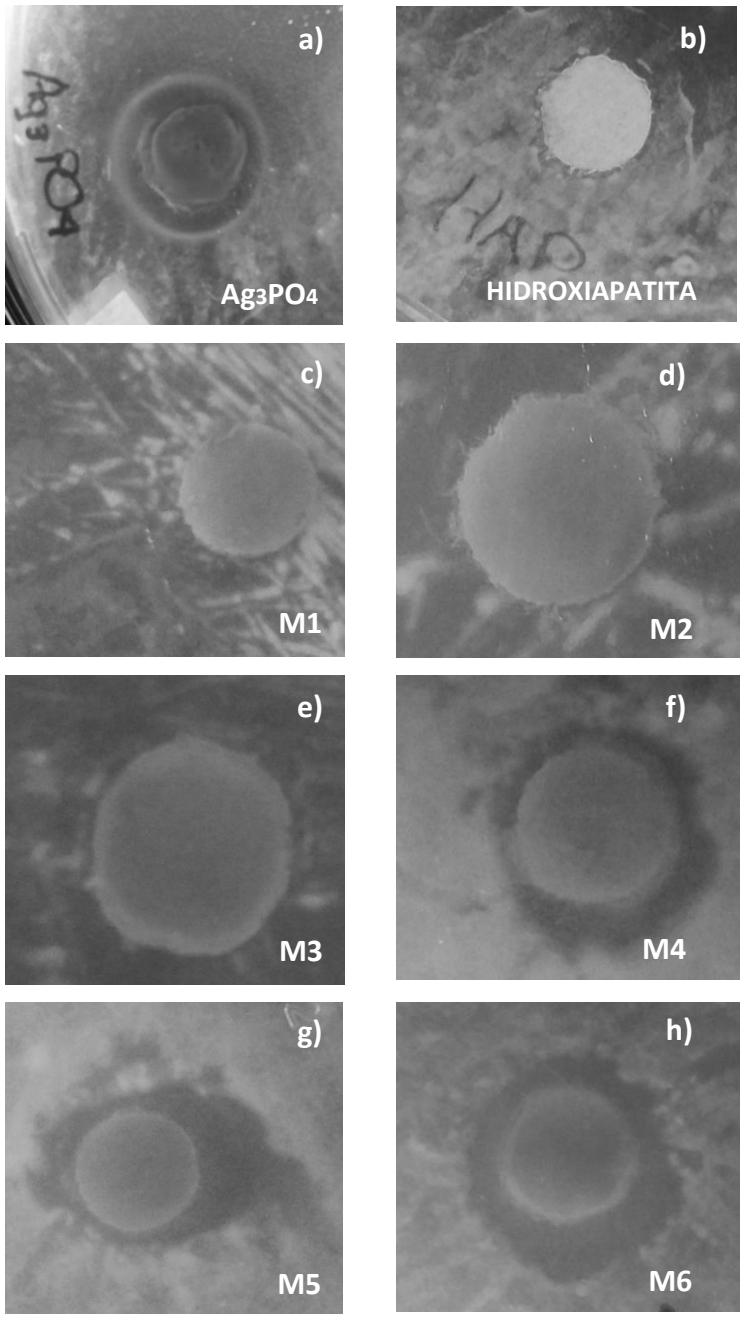


Figura 3.8. Método del halo de inhibición para *Aspergillus niger*. a) Ensayo control negativo: no se observó halo de inhibición en el caso de un disco de papel de filtro embebido con agua desionizada estéril y HA. B) Ensayo control positivo: Se observó halo de inhibición en el caso de un disco de papel filtro embebido con Ag_3PO_4. f)- h) Imagen del halo de inhibición formado alrededor de un disco de papel de filtro embebido con NPs de HA-Ag_3PO_4. c)-d) No se observa halo de inhibición la concentración de NPs (nanopartículas) de HA-Ag3PO4 no es suficientemente fuerte para notar un halo de inhibición.

DISCUSIÓN

A partir del método de precipitación, se desarrolló la síntesis para la obtención de nanopartículas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4.

La síntesis de dichas nanopartículas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4, se comprobó con las técnicas de caracterización: DRX, SEM, EDS y TEM. Estas pruebas demostraron la existencia de las nanopartículas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4.

Las micrografías obtenidas a partir de microscopia electrónica de barrido (SEM), se observa aglomerados de los cuales no se pueden apreciar ninguna estructura definida.

Estas aglomeraciones poseen un tamaño de 5 µm para las muestras de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 (M1-M6), en el caso de las micrografías correspondientes a la hidroxiapatita pura y al Ag_3PO_4 puro se aprecia para la primera una apariencia porosa con morfologías irregulares y en con respecto al Ag_3PO_4 se distinguen partículas con una morfología cubica más definida, aunque dichas estructuras se observan aglomeradas.

Gracias al estudio realizado por SEM y al análisis, se observa que estas partículas tanto para las muestras de M1 a M6, no se puede apreciar ninguna estructura, por lo cual con ayuda de la caracterización nanoestructural por microscopia electrónica de transmisión podremos confirmar si dichas partículas poseen dimensiones nanométricas.

La caracterización nanoestructural por TEM nos mostró para las muestras M1 y M2 la clara presencia de partículas de dimensiones nanométricas de la hidroxiapatita y el Ag_3PO_4.

En el caso de las partículas de hidroxiapatita se observan que tienen forma de rods de diferentes tamaños, mientras que las partículas de Ag_3PO_4 poseen formas circulares de diferentes dimensiones, las formas de las partículas de Ag_3PO_4 por TEM fueron confirmadas, gracias al trabajo realizado por Xiaoting Hong y sus colaboradores en el 2012, donde ellos realizaron la obtención de este nanocomposito comprobando sus propiedades fotocatalíticas.

El análisis químico elemental (EDS) revela la composición de elemental, de las muestras de M1 a M6 (hidroxiapatita-Ag_3PO_4) que están formadas por Ca, P, O y Ag. En el caso de la muestra de

hidroxiapatita pura se obtuvo que la composición elemental es de Ca, P y O. Para la muestra de Ag_3PO_4 pura se revelo la presencia de los elementos P, O y Ag respectivamente.

Se observó en las muestras de M1 a M6 un incremento en el porcentaje en peso de plata, adjuntando los resultados obtenidos por difracción de rayos X que se identificó la presencia de las estructuras cristalinas de la hidroxiapatita y el Ag_3PO_4, así también se realizó una comparación entre los difractogramas obtenidos de todas las muestras, de los cuales se reveló que no hay un corrimiento entre las muestras M1-M6 y las puras como la hidroxiapatita y el Ag_3PO_4 puros, esto nos confirma que no hay formación de ningún enlace químico entre la hidroxiapatita y el Ag_3PO_4.

Mientras que la anchura de lo picos de DRX confirman la presencia de partículas de dimensiones nanométricas, esto adjuntando la información obtenida de TEM.

La medición de la actividad de la propiedad antimicrobiana de las nanopartículas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 se reveló, a través de un estudio antimicrobiano con las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus thuringiensis* y el hongo *Aspergillus niger*.

El análisis de las muestras en la bacteria *Escherichia coli* mostró una buena actividad antimicrobiana a la concentración que se manejó a comparación del caso de la bacteria *Bacillus thuringiensis* se observó que dicha bacteria poseía una mayor resistencia y por lo cual se debe manejar una mayor concentración de nanopartículas para obtener mejores resultados.

El estudio en el hongo *Aspergillus niger* reveló una menor resistencia a las nanopartículas que en el caso de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, en el cual se utilizó una mayor concentración de dichas nanopartículas por las cuales se obtuvieron mejores resultados al inhibir al hongo.

Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de hidroxiapatita-Ag_3PO_4 son gracias a la presencia de la plata, la cual con ayuda de la literatura se conoce su eficiencia históricamente como microbicida en el área de la medicina. Dicho elemento lo tenemos presente dentro del Ag_3PO_4 el cual tiene la capacidad de liberar iones platas que actúan inhibiendo a los microorganismos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de este trabajo nos proporcionaron la información necesaria para saber que gracias a los difractogramas obtenidos por DRX nos confirma la presencia de dos fases cristalinas, características de la hidroxiapatita y el Ag3PO4, esto adjuntando a al análisis químico elemental se observó la presencia en porcentaje en peso de los elementos que compone a nuestro biomaterial.

Así con base en la caracterización del biomaterial, las concentraciones y finalmente el estudio antimicrobiano se concluye que la concentración 70.25M mostró mejor desempeño contra la bacteria *E. coli*, esto se puede explicar debido a que la membrana celular de este modelo bacteriano es del tipo gramnegativa y los otros microorganismos al contar con membranas celulares o mecanismos de protección como la esporulación, en el caso de hongos resultan más resistentes como es el caso del *A. niger* que se manejó una mayor concentración del antimicrobiano de 140.51M.

*Para la bacteria B. thuringiensis con la concentración 70.25M se reveló una menor acción contra dicha bacteria, su explicació*n se debe a que en el caso de la membrana celular de esta bacteria es de un modelo bacteriano del tipo grampositiva que poseen una pared celular más gruesa que las gramnegativas.

El mecanismo de acción de los iones de plata es bien conocido y gracias a la información aportada por el trabajo de Q. L. Feng y colaboradores (Feng, 2000), junto con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que el nuevo material sintetizado y caracterizado tiene actividad antimicrobiana, siendo la muestra M6 la que mejor desempeño obtuvo, esto está directamente relacionado a la mayor concentración de iones de plata, lo cual se demuestra por eds y drx. Aún falta demostrar la actividad antimicrobiana de este biomaterial en modelos in vivo, en donde se evaluó su biocompatibilidad y se demuestre con ayuda de un control que la incidencia de infecciones por implantes disminuye, pero las pruebas antimicrobianas realizadas en este trabajo, dan luz a lo que se puede esperar de este nuevo material.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham GA, Cuadrado TR. Biomateriales y dispositivos cardiovasculares. Rev de la Fed Argent de Cardiol 1997;26(4):491-7

Alejandro Sáenz, Eric Rivera-Muñoz, Witold Brostow and Victor M. Castaño. CERAMIC BIOMATERIALS: AN INTRODUCTORY OVERVIEW.Journal of materials education vol. 21. 1999

B. E. Jones, Cassell's Cyclopaedia of Photography [B], Ayer Publishing, 1973, vol. 401, Phosphate plates and papers

Bellinger CG, Conway H. Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. Plast Reconstr Surg 1970;45:582–5.

Burcu Cengiz, Yavuz Gokce, Nuray Yildiz . Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Elsevier 2008.

Cooke F.W., Lemons J.E., and Ratner B.D., Properties of Materials in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Ratner, B.D., Ho¤man, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., (eds.) Academic Press, New York, NY (1996), pp. 11–35.

C. Guzman Vazquez, C. Piña Barba, and N. Munguıa. "Stoichiometric hydroxyapatite obtained by precipitation and sol gel processes". Revista mexicana de fisica, Junio 2005.

Castellano JJ, Shafii SM, Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ, et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. Int Wound J. 2007;4(2):114–22.

Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? J Antimicrob Chemother 2007;59:587–90.

Chu PK, Liux, editors. Biomaterials fabrication and processing handbook. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2008. p. ix.

Demling RH, DeSanti L. Effects of silver on wound management. Wounds 2001; 13:4.

E. Peón, A Jiménez-Morales, E. Fernandez-Escalante, M.C García-Alonso, M.L Escudero. Recubrimientos de Hidroxiapatita preparados mediante un proceso sol-gel. Metalurgia, Madrid 2005.

Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., and Kim, J. O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J.Biomed Mater.Res. 52:662-668.

Fox CL, Modak SM. Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. Antimicrob Agents Chemother 1974;5(6):582–8.

George C Koumoulidisa, Alexandros P Katsoulidis. Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route. Journal of Colloid and Interface Science. Elsevier 2003.

Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. Introducción a la microbiología, 9° edición, editorial panamericana, 2007.

Gemmell CG, Edwards DI, Frainse AP. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections in the UK. J Antimicrob Chemother 2006;57:589–608.

Hugo WB, Russell AD. Types of antimicrobial agents. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications; 1982. p. 106. 8.

H. R. Liu, Q. Chen, L. Song, R. F. Ye, J. Y. Lu and H. P. Li, J. Ag-doped antibacterial porous materials with slow release of silver ions. Non-Cryst. Solids, 2008, 354, 1314–1317

Informe conciso, La situación demográfica en el mundo, 2014. Departamento de Asuntos Económicos y Sociales División de Población. Naciones Unidas, 2014.

J. C. Coburn and A. Pandit, Development of Naturally-Derived biomaterials and optimization of their biomechanical properties. Biomaterials Chapter 4. 2007

Josheph D. Bronzino, Joon B. Park. Biomaterials: Principles and aplications. CRC PRESS 2002.

J. J. Buckley, A. F. Lee, L. Olivi and K. Wilson, J. Hydroxyapatite supported antibacterial Ag3PO4 nanoparticles. Mater. Chem., 2010, 20, 8056–8063.

J.C. Elliot. Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Elsevier; Amsterdan (1994). 390 pp.

Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Part I early uses. Burns 2000;30:1–9.

Kim, Seak; Kumta, Proshant. "Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder" Matetrials Science and engineering. Vol. 111 (2004); p. 232-236.

Lourdes Amparo Vela R. Determinación del potencial genotóxico de las nanopartículas de plata mediante el análisis del ciclo celular, la apoptosis y el ensayo del cometa en la línea celular BEAS-2B. Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona, España 2012.

LeGeros, R. Z. Kardiologie (Suppl. 3: Vascular Calcifications:Biophysics and Biology); Steinkopf: Darmstadt, Germany, 1999; p116

Landsdown ABG. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. JWound Care 2002;11:125–38.

Liptáková, B; Hronec, M; Cvengrosova, Z. "Direct synthesis of phenol from benzene over hydroxyapatite catalysts". Catalysis today. Vol. 61 (2000); p. 143-148

Londoño, Marta Elena; Echavarria, Alejandro; De la Calle Francenth." Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas". Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 5. Junio 2006; p.109-118

María Teresa Irais Animas Torres, Efrain Rubio Rosas, Ventura Rodriguez Lugo. “Síntesis y caracterización de hidroxiapatita a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio” (2005).

Masahiro Yoshimura and Hiroyuki Suda; Hydrothermal Processing of Hydroxyapatite: Past, present and Future; by CRC Press. Inc. 1994.

M. A. Giardina y M. A. Fanovich. Síntesis de hidroxiapatita por precipitación a partir de Ca(OH)2 y H3PO4 asistida por irradiación ultrasónica. Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Materiales, Buenos Aires, Argentina 2007.

Mahendra Rai ∗, Alka Yadav, Aniket Gade. "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials";Elsevier, Biotechonology advance 27 (2009).

McConnell D. J. Dent Res. The crystal chemistry of carbonate apatite and their relationship to the composition of calcified tissue. 1952. 31:53-63

Melini Batres, Pedro Panlo. "Sintesis de hidroxiapatita para la elaboración de implantes de hueso". Boletín electrónico. No. 6. Facultad de Ingeniería. Universidad Rafael Landivar. Guatemala (2007).

Michael N. Donald F. Gibbons. Biocompatibility: Meeting a key fuctional requirement of next-generation medical devices.Toxicologic Pathology 2008.

Miley, Adriyan; Kannangara, Kamali. "Temperature effects on a Hydroxyapatite precursor solution". J. Phys. Chem. Vol. 108 (2004). p. 5516-5521

M. Teresa Irais Animas, Ventura L, Efrain R. Sintesis y caracterización de Hidroxiapatita a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio. BUAP 2005

M. Zhang, J. K. Liu, R. Miao, G. M. Li and Y. J. Du. Preparation and Characterization of Fluorescence Probe from Assembly Hydroxyapatite Nanocomposite. Nanoscale Res. Lett., 2010, 5, 675–679

Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafo WW. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. Arch Surg 1965;90:812–67.

M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, and G. Dias, Biomaterials, 27, 1728 (2006).

P. Chen, Q. S. Wu and Y. P. Ding, Small, 2007, 3, 644–649

P. Chen, H. W. Liang, X. H. Lv, H. Z. Zhu, H. B. Yao and S. H. Yu. Carbonaceous Nanofiber Membrane Functionalized by beta-Cyclodextrins for Molecular Filtration. ACS Nano, 2011, 5, 5928–5935

Perego, Carlo and Villa, Pierluigi. "Catalyst preparation methods". En: Catalysis today, (1997); p.281-305

Qinghua Liang, Wangjing Ma,a Yao Shi, Zhi Li and Xinmin Yang. Hierarchical Ag3PO4 porous microcubes with enhanced photocatalityc properties synthesized with the assistance of trisodium citrate. CrystEngComm, 2012,14,2966–2973.

Rajabi-Zamani, A; Behnamghader, A; Kazemzadeh, A. "Synthesis of nanocrystalline carbonated hydroxyapatite power via nonalkoxide sol-gel method". Materials Science and Engineergin. February 2008.

Richard JW, Spencer BA, McCoy LF, Carina E,Washington J, Edgar P, et al. Acticoat versus silverlon: the truth. J Burns Surg Wound Care 2002;1:11–20.

Ring, M. E. Dentistry: An Illustrated History; Abrade Press: New York, 1985; p 15

Rivero, R; Barba, M; Rodríguez, M. "Influencia de los parámetros de síntesis en la obtención de Hidroxiapatita por el método de combustión". Boletín de la Sociedad española de cerámica y vidrio. Campus de Cantoblanco, Madrid, España. Vol. 46 (2007); p.299-303.

R. Legeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, J.Legeros. "Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications". Journal of materials science: Materials in Medicine. Vol. 14. 2003. pp. 201-209.

Robert Langer and David A. Tirrell. Designing materials for biology and medicine. Nature vol 428. 2004.

Rodríguez-Lugo, G.A. Camacho-Bragado, and V.M. Castaño; Morphological and Compositional Changes on Sand Dollar Biomaterials Induced by Heat Treatments; 2003.

R. S. Taichman and P. V. Hauschka. Effects of interleukin-1β and tumor necrosis factor-α on osteoblastic expression of osteocalcin and mineralized extracellular matrix in vitro. Inflammation, 1992, 16, 587–601.

Solomon, P., Berg, L. & Martin, D.W. Biología (McGrawHillInteramericana, México, 2001).

Smith Deanne, K. Calcium phosphate apatites in nature. In Hydroxyapatite and related materials (eds. Browns, P.W. & Constantz, B., 1995) 46-52 (CRC Press, London, 2000).

Seckler, Marcelo; Carrodeguas, Raul; Silas, Derenzo; Giulietti, Rafael. Técnicas de obtención de hidroxiapatitas y otros fosfatos de calcio. Instituto de psquisas tecnológicas, Sao Pablo, Brasil.

Simchi A, et al. Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications. Nanomedicine. 2011;7(1):22–39.

Takash, Tsuchida. Shuji Sakuma Tatsu y Takeguchi, and Wataru Ueda. Direct Synthesis of n-butanol from ethanol over nonstoichiometric Hydroxyapatite. Eng. Chem. Res. 2006, 45, 8634-864.

Tresguerres, J.A.F. Fisiología humana (McGrawHill Interamericana,2003) 2ª ed. págs. 983-1020.

T. Fintan Moriarty, Sebastian A.J. Zaat, Henk J. Busscher . " Biomaterials Associated Infection: Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies". Springer, 2013.

U. Gburecka, O. Grolmsa, J. Barraletb, L. Groverb, R. Thulla. "Mechanical activation and cement formation of b-tricalcium phosphate". Biomaterials. Vol. 24. 2003. pp. 4123-4131.

Wang Feng,b, Li Mu-sena, Lu Yu-penga, Qi Yong-xina. A simple sol–gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. Materials Letters. Elsevier 2005.

X. Ge, Y. Leng, C. Bao, S. L. Xu, R. Wang, F. Ren, J. Antibacterial coatings of fluoridated hydroxyapatite for percutaneous implants. Biomed. Mater. 95 (2010) 588.

X. G. Ma, B. Lu, D. Li, R. Shi, C. S. Pan and Y. F. Zhu. Origin of Photocatalytic Activation of Silver Orthophosphate from First-Principles.J. Phys. Chem. C, 2011, 115, 4680–4687

Xuejiang Wang, Yubao Li, Jie Wei, Klass de Groot; Development of Biomimetic Nanohydroxyapatite/ poly (hexamethylene adipamide) composites; 2002.

Xiaoting Hong, XiaohuiWu, QiuyunZhang, MingfengXiao, GelinYang, MeirongQiu, GuochengHan. "Hydroxyapatite supportedAg3PO4 nanoparticles withhighervisiblelight photocatalytic activity". ELSEVIER, 258 (2012) 4801–4805.

Yingjun Wang, Shuhua Zhang. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template. Materials Letters. Elsevier 2006.

Y. J. Zhan and S. H. Yu, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 5650–5651

Y. P. Liu, L. Fang, H. D. Lu, L. J. Liu, H. Wang, and C. Z. Hu, "Highly efficient and stable Ag/ Ag_3PO_4 plasmonic photocatalyst in visible light", Catal. Commun. vol. 17, pp. 200-204, 2012.

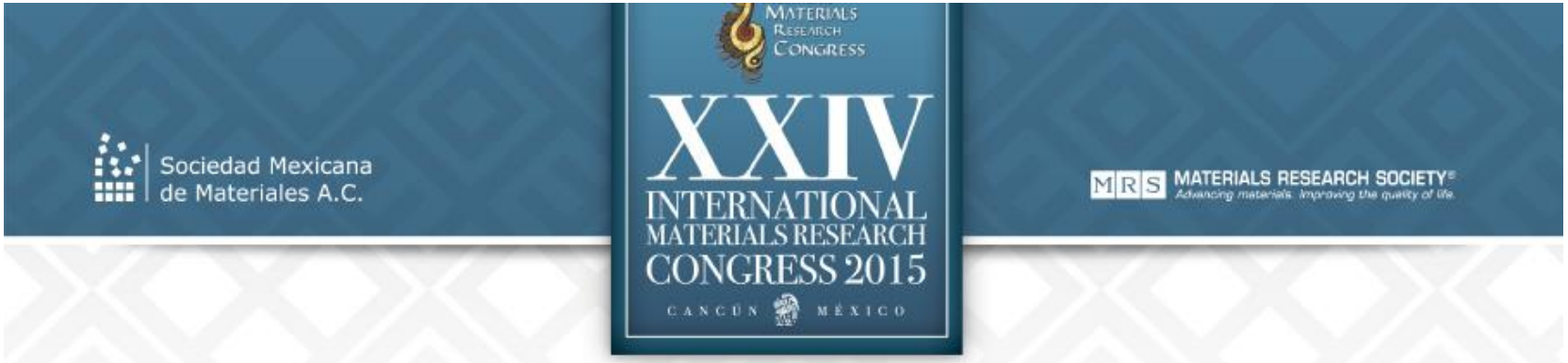
Z.G. Yi, J.H. Ye, N. Kikugawa, T. Kako, S.X. Ouyang, H. Stuart-Williams, H. Yang, J.Y. Cao, W.J. Luo, Z.S. Li, Y. Liu, R.L. Withers, An orthophosphate semiconductor with photooxidation properties under visible-light irradiation, Nature Materials 9 (2010) 559–564.

Zimmerli W, Trampuz A. Implant-associated infections. In Bjarnsholt T, Moser C, Jensen P, Rigshopitalet HS, Hoiby N (Eds): Bio film infections. Springer Science; 2011. pp. 69–89.

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

Participaciones en:

- ✓ Presentación oral del Proyecto de tesis: Estudio de la actividad antimicrobiana del Sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4. XXIV International materials research congress 2015. Cancún, Quintana Roo.
- ✓ Presentación del trabajo (poster):"Estudio de la actividad antimicrobiana del sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4". En el 1er encuentro de estudiantes en ciencia e ingeniería de materiales, Mayo 2015.
- ✓ Presentación del trabajo (poster):"Estudio de la actividad antimicrobiana del sistema hidroxiapatita-Ag_3PO_4". Congreso nacional de Física 2015. Mérida, Yucatán.



The Organizing Committee
Acknowledges the Participation of

Ana Lourdes Hernández de Huerta

in the

XXIV International Materials Research Congress

Cancún, México. August 2015

J. Gerardo Cabañas Moreno
Sociedad Mexicana de Materiales
PRESIDENT

Sociedad Mexicana
de Materiales A.C.

August 2015

TO WHOM IT MAY CONCERN
P r e s e n t

This is to certify that *Ana Lourdes Hernández de Huerta, Eric Reyes Cervantes, Ricardo Agustín Serrano, Efrain Rubio Rosas* presented the contribution: **ANTIMICROBIAL ACTIVITY STUDY OF HYDROXYLAPATITE- AG_3PO_4 SYSTEM,** in the Biomaterials for Medical Applications Symposium at the XXIV International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 16th to 20th, 2015.

Sincerely,

José Gerardo Cabañas Moreno
President

528- 0033

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento
Sociedad Mexicana de Materiales A.C.

Otorgan la Presente

CONSTANCIA

A: A. L. Hernández de Huerta, E. Rubio Rosas , E. Reyes Cervantes, Ma. Lourdes Palma Tirado y R. Agustín-Serrano

Por haber presentado el trabajo (poster) "Estudio de la actividad antimicrobiana del sistema Hidroxiapatita-Ag3PO4" en el 1er Encuentro de Estudiantes en Ciencia e Ingeniería de Materiales que se llevó a cabo los días 20 y 21 de Mayo de 2015

Dr. Pedro Hugo Hernández Tejeda
Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento
Director

Dr. José Gerardo Cabañas Moreno
Sociedad Mexicana de Materiales A.C.
Presidente

M en C. Eric Reyes Cervantes
Capítulo estudiantil BUAP de la Sociedad Mexicana de Materiales A.C.
Presidente

Sociedad Mexicana de Materiales A.C.

Ingeniería en Materiales

DITCo

CUVyTT
Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología

La Sociedad Mexicana de Física

Agradece la asistencia y participación de:

Ana Lourdes Hernández de Huerta

Facultad de Ingería Química
Universidad Autónoma de Puebla

en el

LVIII Congreso Nacional de Física y Congreso Latinoamericano de Física 2015

del 5 al 9 de octubre de 2015
Hoteles Fiesta Americana y Holiday Inn
Mérida, Yucatán

Susana Lizano S.

Dra. Estela Susana Lizano Soberón
Presidenta de la SMF